

Radikaldanning i røntgenbestrålte einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin ved 295 K og 77 K

Eit EPR-, ENDOR-, EIE- og DFT-studium

av

Kristine Eldevik



Masteroppgåve i fysikk

Fysisk institutt

Universitetet i Oslo

Mai 2006

Forord

Det føreliggande arbeidet er utført ved gruppa for biofysikk og medisinsk fysikk ved Fysisk institutt, Universitet i Oslo. Primærveilederen min har vore Einar Sagstuen med Eli Olaus Hole som sekundærveileder. Begge skal ha stor takk for god oppfølging, konstruktiv kritikk og for ei enorm evne til alltid å vere tilgjengelege, både på kontor og per epost/telefon. Det skriftlege (nynorske) produktet har vorte kontrollert både av Ingunn og Reidulf, noko eg har sett stor pris på.

Elles vil eg nytte høvet til å takke familien min for all omtanke og støtte opp gjennom åra, venane mine for at dei er akkurat dei dei er og Hans Eric for at han alltid er der for meg. Og til slutt ein takk til alle ansatte og studentar på biofysikkgruppa for ei lærerik og hyggelig tid.

Oslo, mai 2006

Kristine Eldevik

Samandrag

EPR-spektroskopi, med avartar som ENDOR og EIE, er veletablerte teknikkar for studiar av radikaldanning i einkrystallar. Hovudmålet med dette arbeidet har vore å identifisere kva radikal som vert danna i einkrystallar av dipeptidet N-acetyl-L-tyrosin etter røntgenbestråling ved 295 K og 77 K. Arbeidet føyer seg inn i eit større prosjekt der generelle strålingsmekanismar for enkle aminosyrer og dipeptid vert undersøkt i håp om å finne kva stråleeffektar som vil kunne gjere seg gjeldande på makromolekylært nivå. I tillegg til dei spektroskopiske teknikkane nemnt over vart det gjort Density Functional Theory (DFT) molekylorbital-berekningar av dei føreslåtte radikalstrukturane.

Røntgenbestråling av einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin ved romtemperatur (295 K) produserar minst tre stabile radikal (I-III). Radikal I er identifisert som eit nøytralt tyrosylradikal, danna ved ein oksidasjon av OH-gruppa bunde til den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin. Frå tidlegare studiar veit ein at liknande tyrosylradikal er viktige komponentar i fotosystem II, i ribonukleotid reduktase (RNR) og i prostaglandin-H-syntase. Radikal II er ikkje fullt ut identifisert i dette arbeidet, men ei av hypotesane er at radikalet er eit oksidasjonsprodukt danna ved ein netto hydrogenabstraksjon av H(3-1)/H(3-2). Radikal III gjev berre ei kopling og ein klar dublett i EPR-spekteret. Ein kandidat til radikal III er σ -radikalet danna ved β -OH-eliminasjon av karboksylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin. Ein annan kandidat er det protonerte karboksylanionet i N-acetyl-L-tyrosin. Ingen av dei to kandidatane har godt nok samsvar med radikal III til at ein med visse kan fastslå radikalstrukturen.

På grunn av elektronkonfigurasjonen sin er radikal vanlegvis svært reaktive og dei vil i løpet av kort tid inngå i nye reaksjonar og danne nye kjemiske konfigurasjonar. I romtemperaturstudiar detekterer ein normalt difor berre dei stabile sluttprodukta i lengre reaksjonssekvensar. Ved lave temperaturar vil reaksjonane gå saktare og det vil vere mogleg å detektere dei radikala som primært vert danna ved ioniserande stråling og som er forløparane til dei produkta ein ser ved romtemperatur. Einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin vart difor kjølte til 77 K med flytande nitrogen både under røntgenbestråling og målingar. Resultata frå desse eksperimenta viser stabilisering av minst tre radikal A, B og C ved 77 K. Radikal A er identifisert som tyrosylradikalet (jamfør radikal I) og radikal B er identifisert som eit dekarboksylert N-acetyl-L-tyrosin-kation. Dekarboksyleringsprodukt er av dei vanlegaste oksidasjonsprodukta, danna i aminosyrer og peptid utsette for ioniserande stråling. Radikal C er truleg eit protonert karbonylanion. Det vart og gjort oppvarmingsforsøk der stabiliteten til dei ulike lågtemperaturredikala vart undersøkt. Moglege mekanismar som knyt saman resultata ved 77 K og resultata ved 295 K er diskuterte og jamførte med ulike data på dipeptid frå litteraturen.

Innholdsliste

1	INNLEIING	1
1.1	IONISERANDE STRÅLING OG RADIKALDANNING	1
1.2	STRÅLEEFFEKTER I AMINOSYRER OG DIPEPTID	4
1.3	N-ACETYL-L-TYROSIN	6
2	TEORI	9
2.1	MAGNETISK RESONANS	9
2.1.1	Spinnvekselverknad i magnetisk felt	9
2.1.2	Overgangssannsyn og relaksasjonstider	11
2.1.3	Spinnpopulasjon og relaksasjonstider	13
2.2	UPARA ELEKTRON I MOLEKYLÆRE OMGJEVNADAR	15
2.2.1	Spinn-Hamiltonoperator	15
2.2.2	Koplingstypar	19
2.3	RESONANSTEKNIKKAR	22
2.3.1	Electron Paramagnetic Resonance (EPR)	22
2.3.2	Electron Nuclear DOuble Resonance (ENDOR)	24
2.3.3	ENDOR Induced EPR (EIE)	25
3	MATERIAL OG METODAR	27
3.1	KRYSTALLAR, SITE-SPLITTING OG SCHONLANDS TVITYDNAD	27
3.2	RØNTGENDIFFRAKSJON OG KRYSTALLMONTERING	28
3.3	N-ACETYL-L-TYROSIN	29
3.4	RØNTGENBESTRÅLING	31
3.5	EPR-SPEKTROMETERET	31
3.6	EPR/ENDOR/EIE- APPARATUR OG PARAMETRAR	33
3.7	DENSITY FUNCTIONAL THEORY (DFT)	35
4	RESULTAT OG ANALYSE AV ROMTEMPERATURDATA	39
4.1	EPR-RESULTAT (295 K)	39
4.2	ENDOR OG EIE AV N-ACETYL-L-TYROSIN (295 K)	42
4.3	RADIKAL I	48
4.3.1	Analyse av koplingar, radikal I	49
4.3.2	Kandidat til radikal I: Tyrosylradikal	50
4.3.3	DFT-berekningar for tyrosylradikal	52
4.3.4	Simuleringar radikal I	55
4.4	RADIKAL II	57
4.4.1	Analyse av koplingar, radikal II	59
4.4.2	Kandidat til radikal II: H-addisjonsradikal	60
4.4.3	DFT-berekningar av H-addisjonsradikal	64
4.4.4	Kandidat til radikal II: C3-oksidasjonsradikal	68
4.4.5	DFT-berekningar av C3-oksidasjonsradikal	70
4.5	RADIKAL III	73
4.5.1	Analyse av kopling, radikal III	74
4.5.2	Kandidat til radikal III: σ -radikal	75
4.5.3	DFT-berekningar av σ -radikal	75
4.5.4	Kandidat til radikal III: Protonert karboksylanion	77
4.5.5	DFT-berekningar av protonert karboksylanion	78
4.5.6	Simuleringar radikal III	79

5	RESULTAT OG ANALYSE AV LÅGTEMPERATURDATA.....	81
5.1	EPR-RESULTAT (77 K)	81
5.1.1	Radikal A	83
5.2	ENDOR OG EIE AV N-ACETYL-L-TYROSIN (77K)	84
5.3	RADIKAL B	89
5.3.1	Analyse av koplingar, radikal B	90
5.3.2	Kandidat til radikal B: Dekarboksylert kation.....	91
5.3.3	DFT-berekingar av dekarboksylert kation.....	94
5.3.4	Simuleringar radikal B	97
5.4	RADIKAL C	101
5.4.1	Analyse av kopling, radikal C	102
5.4.2	Kandidat til radikal C: Protonert karbonylanion	102
5.5	RESULTAT AV OPPVARMINGSFORSØK	107
6	OPPSUMMERING OG DRØFTING	111
6.1	ROMTEMPERATURRADIKAL	111
6.1.1	Radikal I.....	111
6.1.2	Radikal II.....	112
6.1.3	Radikal III	115
6.2	LÅGTEMPERATURRADIKAL	116
6.2.1	Radikal B.....	117
6.2.2	Radikal C.....	119
6.3	OPPSUMMERING OG NOKRE FORSLAG TIL VIDARE STUDIAR	121
	REFERANSAR.....	125
	APPENDIKS.....	131
A	KRYSTALLOGRAFISKE DATA	131
B	DATAPROGRAM	137
C	HYPERFINKOPLINGSTENSORAR.....	139

1 Innleiing

Stråling frå naturlege og menneskeskapte kjelder er ein uunngåeleg komponent av livet her på jorda. Ioniserande stråling er elektromagnetisk stråling eller partikkelstråling som har høg nok energi til å lausrive elektron frå atom eller molekyl. Når eit biologisk system vert utsett for ioniserande stråling viser det seg at strålinga kan skade cellene og i verste fall kan celledødane føre til mutasjonar* eller celledød (Alberts *et al.*, 1994). Samstundes nyttast ioniserande stråling både innan medisinsk diagnostikk og innan kreftterapi. Diagnostikken er i høg grad avhengig av bildedannande metodar og fleire av desse metodane baserar seg på røntgenstråling som er ein type ioniserande stråling. I kreftterapien utnyttar ein at ioniserande stråling kan drepe celler ved å bestråle kreftsvulstar med energetiske røntgenstrålar. I alle høver er det ønskeleg at friskt vev ikkje tek skade av strålinga. Forsking på kva innverknad ioniserande stråling har på biologiske system synast difor å vere av stor tyding.

1.1 Ioniserande stråling og radikaldanning

Ioniserande stråling kan både vere elektromagnetisk stråling i form av energetiske foton og ladde partiklar som elektron, proton, heliumkjernar eller andre tyngre kjernar. For å indusere stråleskader i molekyl er det i dette prosjektet nytta røntgenstråling, som er ein type ioniserande elektromagnetisk stråling. Røntgenstråling oppstår når ladde partiklar med høg hastigheit vert akselerert eller deakselerert og når eit atom går frå eit høgare til eit lågare energinivå. Røntgenfotona vekselverkar med materie hovudsakleg gjennom to prosessar; fotoelektrisk effekt og comptonspreiing. Ved fotoelektrisk effekt vil fotonet gje all energien sin til eit atomært elektron og dersom fotonenergien er høgare enn bindingsenergien til det atomære elektronet vil elektronet kunne frigjere seg frå atomet. Har fotonet tilstrekkeleg høg energi kan det, i tillegg til å sparke ut eit elektron, sjølv fortsetje med redusert energi og endra retningsvinkel. Denne effekten kallast Comptonspreiing. Begge desse prosessane gjev opphav til sekundære elektron som igjen kan ionisere eller eksitere nye molekyl (Attix, 1986).

Når molekyl i biologiske system vert bestrålte, vil molekyla absorbere strålingsenergi ($h\nu$) som skildra over. Etter energiabsorpsjonen vil ulike reaksjonar vere moglege. Reaksjonane kan skje i fleire steg og dei viktigaste er lista nedanfor (M er her eit biomolekyl som blant anna inneheld hydrogen):

* Mutasjonar er permanente endringar i basesekvensen til eit DNA-molekyl.

(I)	$M + h\nu$	\rightarrow	$M^{\bullet+} + e^-$	(Ionisering, kationdanning)
(II)	$M + e^-$	\rightarrow	$M^{\bullet-}$	(Elektroninnfanging, aniondanning)
(III)	$M + h\nu$	\rightarrow	M^*, M^{**}	(Danning av eksiterte tilstandar)
(IV)	$M^{\bullet+} + e^-$	\rightarrow	M^*, M^{**}	(Rekombinasjon)
(V)	$M^{\bullet+}$	\rightarrow	$M^\bullet + H^+$	(Deprotonering)
(VI)	$M^{\bullet-} + H^+$	\rightarrow	$M^\bullet H$	(Protonering)
(VII)	M^*	\rightarrow	$M^\bullet + H^\bullet$	(Hydrogenabstraksjon 1)
(VIII)	$M + H^\bullet$	\rightarrow	$M^\bullet H$	(Hydrogenaddisjon)
(IX)	$M + H^\bullet$	\rightarrow	$M^\bullet + H_2$	(Hydrogenabstraksjon 2)

Reaksjon (I-III) skildrar primære strålingsabsorpsjonar i molekyl. Slike reaksjonar skjer raskt etter bestråling av primærmolekylet, i løpet av eit tidsrom på typisk 10^{-12} til 10^{-17} sekund. I stabile molekylære system opptre vanlegvis elektrona i par. Reaksjon (I) og (II) gjev strålingsprodukt som har eit upara elektron og slike produkt vert kalla radikal. Danninga av kationradikalet i reaksjon (I) er ein spesielt viktig prosess. Den kinetiske energien til elektronet som blir frigjeve i denne prosessen avgjer om elektronet kan unngå rekombinasjon (IV) og i staden danne nye ionisasjonar og eksitasjonar, før det vert fanga inn av eit nytt molekyl (II) ein viss avstand frå der den primære ionisasjonen fann stad. Danning av eksiterte tilstandar (III) er av mindre relevans sidan eksiterte molekyl for det meste returnerar til grunntilstanden ved å kvitte seg med overskotsenergi gjennom radiative- eller ikkje-radiative relaksasjonsprosessar. Reaksjonane (V) og (VI) er viktige bindingsnøytraliserande prosessar. I tidsrom på pikosekund til millisekund kan reaksjonane V-IX føre til kjemiske endringar i makromolekyla medan dei eventuelle biologiske effektane som celledød, mutasjonar eller kreft først trer i kraft dagar, månadar eller år etter den primære strålehendinga.

Forsking på stråleeffektar i biologiske system kan historisk delast i to retningar. Ei retning som studerar stråleeffektar på celler, virus eller større biologiske system og ei anna retning som studerar stråleeffektar på molekylært nivå som til dømes i nukleinsyrer og protein.

Studiar av strålingseffekt på celler gjev klare indikasjonar på at *DeoxyriboNukleic Acid*-molekylet (DNA) er den mest strålefølsame delen av ei celle (Hall, 1994). Men kva effektar som på molekylært nivå er årsak til dette, gjev desse studia ikkje svar på. Ved å studere radikaldanning i sjølve DNA-molekylet, i dei enkelte komponentane til DNA-molekylet eller i protein som er produkt av DNA-transkripsjon, kan ein få kunnskap om kva slags skader som vert indusert av ioniserande stråling og korleis desse skadane manifesterar seg på eit molekylært nivå.

DNA-molekylet inneheld genetisk informasjon og er lokalisert til cellekjernane i kroppscellene. DNA-molekylet er bygd opp av lange kjeder av nukleotid. Kvant nukleotid består av tre komponentar, ein sukkerart (deoksyribose) som er bunde til ein nitrogenbase (adenin, cytosin, guanin eller tymin) og ei fosfatgruppe. Nukleotidkjedene er kveila opp ved sidan av kvarandre og dannar ein dobbelt heliks. Heliksen vert halden saman av hydrogenbindingar mellom komplementere nitrogenbasar (adenin-tymin/cytosin-guanin) i dei to kjedene. I mange organismar kan den totale lengda av DNA-tråden verte opp til 2 meter, så for at den skal ta opp minst mulig plass vert den i store delar av cellesyklus kveila opp saman med vassmolekyl til meir kompakte strukturar, kalla nukleosom. I eit nukleosom er DNA-tråden vikla rundt åtte protein kalla kjernehiston og denne strukturen gjentek seg langs heile DNA-tråden. Det vil vere eit stort nettverk av protein med på å halde desse strukturane saman. Kunnskap om stråleeffektar i DNA og protein er difor viktig frå mange ståstar.

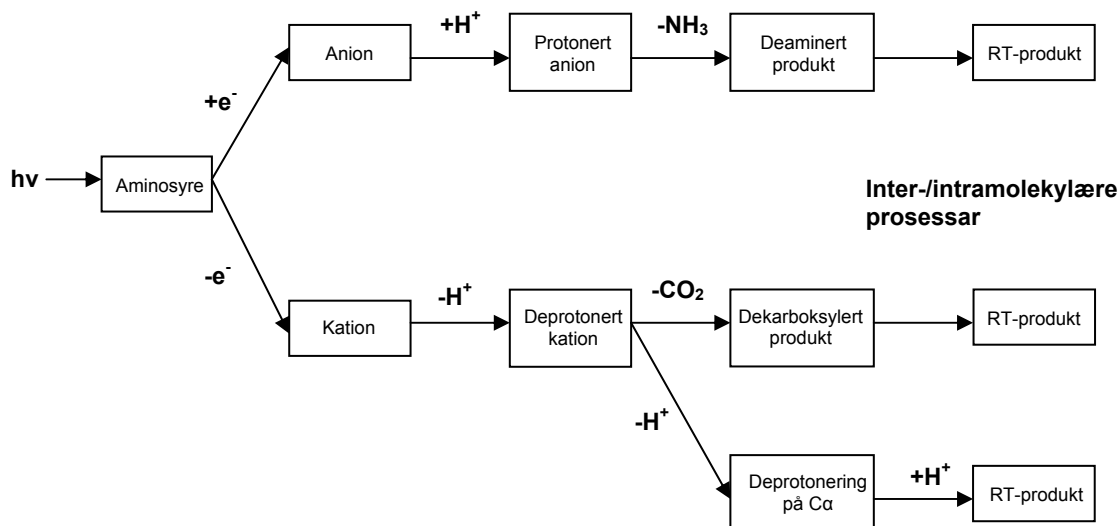
På grunn av sitt upara elektronspinn eignar radikal seg svært godt til studiar med spektroskopiske teknikkar som *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) og *Electron Nuclear Double Resonance* (ENDOR). Ved eksperimentelt å bestemme \hat{g} - og \hat{A} -tensorane i spinn-Hamiltonoperatoren (sjå kapittel 2.2.1) kan radikala identifiserast. Men tensorane let seg berre fullt ut bestemme i einkrystalleksperiment der alle anisotrope effektar er under kontroll. Dette representerar eit problem sidan det viser seg å vere vanskeleg å lage store nok einkrystallar av protein og nukleinsyrer til at ein får tilfredstillande EPR-signal. For å forstå reaksjonsprosessane som følgjer av stråleskader i slike makromolekyl, må ein difor basere seg på tilnærmingar og bruk av modellsystem. Ei tilnærming er å studere dei enkelte byggjesteinane til nukleinsyrer og protein. Ein håpar slik at kunnskap om kva radikal som vert danna og om kva prosessar som ligg bak radikaldanninga i desse mindre komplekse systema, kan skape eit bilete av prosessane som tek plass i makromolekyla.

Ein konsekvens av elektronkonfigurasjonen til radikal at dei vanlegvis er svært reaktive og at dei i løpet av kort tid vil inngå i nye reaksjonar og dermed danne nye kjemiske konfigurasjonar. I studiar ved romtemperatur detekterer ein normalt difor berre dei stabile sluttprodukta i lengre reaksjonssekvensar. Ved å gjere målingar ved lave temperaturar der

reaksjonane går langsamare, er det mogleg å detektere dei radikala som primært vert danna ved bestråling og som er forløparane til dei produkta ein ser ved romtemperatur.

1.2 Stråleeffektar i aminosyrer og dipeptid

I kroppen er det omtrent 30 000 ulike protein og proteina spelar ei avgjerande rolle for dei aller fleste av funksjonane til ei celle. Alle protein har aminosyrer som byggjesteinar. Aminosyrene har ei aminogruppe, ei karboksylgruppe og eit hydrogenatom bunde til eit sentralt karbonatom. Ved kondensasjonsreaksjonar mellom karboksylgruppa i ei aminosyre og aminogruppa i ei anna aminosyre kan aminosyrene danne lange kjeder (polypeptid) og bindinga mellom dei kallast peptidbinding (Sand *et al.*, 2001).



Figur 1.1: Skjematisk framstilling av ulike strålingsinduserte radikalprodukt danna i dei enkle aminosyrene α -glysin og L- α -alanin (Sagstuen *et al.*, 2004, modifisert).

Stråleeffektar i einkrystallar av enkle aminosyrer er relativt godt kartlagt etter pionerarbeid gjort i 1960-åra (Box, 1977; Henriksen *et al.*, 1976) og i seinare komplementære arbeid (Sagstuen *et al.*, 2004). Det har vorte gjort forsøk både ved romtemperatur og ved lågare temperaturar som t.d. 10 K og 77 K. I enkle aminosyrer er både dei primære oksidasjons- og reduksjonsprodukta* lokaliserte til karboksylgruppa. Oksidasjonsproduktet (kationet) viser seg å vere relativt ustabil og vil raskt dekarboksylere ved avspalting av karboksylgruppa. Det

* Ein prosess der eit molekyl, atom eller ion mistar eit elektron eller eit hydrogenatom, kallast ein *oksidasjon*. Ein prosess der eit molekyl, atom eller ion fangar inn eit elektron eller eit hydrogenatom kallast ein *reduksjon*.

attverande produktet vert så vanlegvis utsett for ulike inter- eller intramolekylære* prosessar som leiar til fleire ulike sekundære romtemperatur(RT)-radikal. Reduksjonsproduktet (anionet) synast derimot å vere noko meir stabilt, men det vil likevel verte utsett for ei deaminering ved at aminogruppa vert spalta av. Deamineringsprodukt er ofte stabile ved romtemperatur. Dei ulike resultata frå studiar av dei enkle aminosyrene α -glysin ($\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) og L- α -alanin ($\text{NH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$), er oppsummerte i figur 1.1 (Sagstuen *et al.*, 2004, modifisert).

Dersom ein introduserar andre sidegrupper enn dei som er tilstades i dei enkle aminosyrene α -glysin og L- α -alanin, vil sidegruppene generelt modifisere radikalprosessane på måtar som er spesifikke for kvar enkelt sidegruppe. Dette vil særskilt gjelde aromatiske sidegrupper og sidegrupper som inneheld svovel. Likeeins vil peptidbindinga i dipeptid truleg kunne introdusere andre moglege radikalprosessar enn dei som er skisserte i figur 1.1. Mengda rapporterte einkrystallstudiar av dipeptid føreteke med EPR/ENDOR-spektroskopi, er førebels avgrensa. Dipeptida N-acetylglysin ($\text{CH}_3\text{CONHCH}_2\text{COOH}$) og glycyl-glysin ($\text{NH}_3\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$) er av dipeptida som har best kartlagde radikalprosessar (Henriksen *et al.*, 1976; Melø, 1975). Oppsummert syner dei ulike studia av desse dipeptida at oksidasjonsprosessane følgjer same mønster som dei enkle aminosyrene i figur 1.1. Men reduksjonsprosessane ser derimot ut til å kunne skje både i karboksylgruppa og i peptidbindinga (Box *et al.*, 1972; Sinclair og Codella, 1973; Melø, 1973). Dei påfølgjande sekundærreaksjonane (som deaminering eller brot i C-N-bindinga) kan difor stamme frå begge desse posisjonane. Ved romtemperatur er ”backbone”-radikalet, danna ved H-abstraksjon frå det sentrale karbonatomet C_α , observert som eit stabilt radikal både i N-acetylglysin (Miyagawa, 1960; Sinclair og Codella, 1973) og i glycyl-glysin (Katayama og Gordy 1961; Melø, 1971).

Eit ”backbone”-radikal er også observert i einkrystallar av dipeptidet N-formylglysin ($\text{CHONHCH}_2\text{COOH}$) bestrålte ved romtemperatur. Som for N-acetylglysin og glycylglysin er forløparen til ”backbone”-radikalet i N-formylglysin funne å vere eit dekarboksylert kation (Sagstuen *et al.*, forventa publisert 2006).

Det er og rapportert studiar på meir komplekse dipeptid som hippursyre, som har struktur som N-acetylglysin men med metylgruppa erstatta av ein fenyling. Desse studia viste at bestråling ved romtemperatur produserar eit dekarboksylert oksidasjonsprodukt og eit reduksjonsprodukt danna ved ein netto H-addisjon til den aromatiske ringen (Salih *et al.*, 1997). Det er ikkje rapportert radikalprodukt av den deaminerte typen for denne sambindinga.

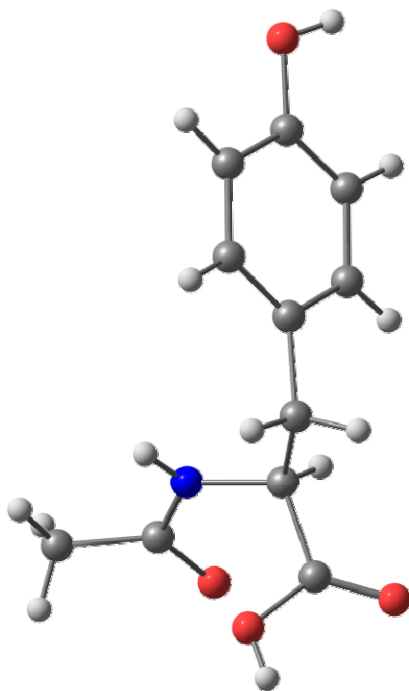
* Inter- er ei forstaving som tyder *mellom* eller *blant*, medan intra- tyder *innanfor* eller *inne i*. Intermolekylære radikalprosessar vert slik prosessar der omgjevnadane til molekylet på ein eller annan måte bidreg, medan intramolekylære prosessar er prosessar som føregår innanfor eit og same molekyl.

Dette er føreslått å vere årsaka av at den aromatiske fenytringen i hippursyre vil ha ein stabiliserande effekt i forhold til peptidbindinga og verne denne mot bindingsbrot som følgje av reduksjonsprosessar. Dei molekylære prosessane som fører til danning av romtemperaturreadikala for hippursyre er ikkje kjende sidan det ikkje er gjort vellukka lågtemperaturstudiar av sambindinga (Eliassen, M. H., 2005).

Andre arbeid på dipeptid inkluderar N-acetyl-DL-alanin (Katayama, 1962; Haynes *et al.*, 1980) og N-acetyl-L-alanin (Saxeboel, 1975). I einkrystallar av N-acetyl-DL-alanin ($\text{CH}_3\text{CONHCHCH}_3\text{COOH}$) er det stabile romtemperaturreadikalet identifisert til å vere eit ”backbone”-radikal. Romtemperaturstudiar av L-forma av dette dipeptidet (N-acetyl-L-alanin) viste ikkje dette backboneradikalet men viste derimot eit deamineringsprodukt. Det er føreslått at ulikskap i krystallstruktur for dei to systema kan ha innverknad på prosessane for sekundære radikaldanningar.

1.3 N-acetyl-L-tyrosin

N-acetyl-L-tyrosin er eit dipeptid av den viktige aminosyra L-tyrosin, sjå molekylmodell i figur 1.2. Tyrosin er ei av dei 20 essensielle aminosyrene som cellene nyttar som byggjesteinar i proteinsyntesa.



Figur 1.2: Struktura til eit N-acetyl-L-tyrosin-molekyl. Dei grå sfærane er karbonatom, dei kvite er hydrogenatom, dei raude er oksygenatom og den blå er eit nitrogenatom.

Radikaldanning i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin ved romtemperatur har tidlegare vorte studert av Mezetti *et al.* (1999). I dette arbeidet vart det observert tre stabile radikal ved romtemperatur og desse vart føreslått å vere eit tyrosylradikal danna ved ein oksidasjon av OH-gruppa bunde til den aromatiske ringen, eit reduksjonsprodukt danna ved ein netto hydrogenaddisjon til den aromatiske ringen og eit σ -radikal danna som ein sekundærprosess etter ein reduksjon av karboksylgruppa.

Frå litteraturen har ein klare haldepunkt for at oksidasjon av aminosyra tyrosin kan gje eit tyrosylradikal med eitt upara elektron delokalisert over den aromatiske ringen. Slike tyrosylradikal spelar ei viktig rolle i fleire biologiske system, som til dømes i fotosystem II i plantar, algar og cyanobakteriar (Hoganson *et al.*, 1995), i ribonukleotid reduktase (RNR) (Hoganson *et al.*, 1996) og i prostaglandin-H-syntese (Smith *et al.*, 1992). Eit fotosystem består av multiproteinkompleksar som omdannar lysenergi lagra i klorofyllmolekyl, til kjemisk nyttige energiformer. RNR er eit enzym som er tilstades i alle delande celler og som katalyserar oksidasjonen av ribonukleotid til deoxyribonukleotid. Dette er eit fundamentalt steg for DNA-replikasjon og ulike reparasjonsprosessar (Eklund *et al.*, 2001). Prostaglandin er signalstoff som vert danna i dei fleste vev og organ og som inngår i mange ulike biologiske aktivitetar. Prostaglandin deltek blant anna i smerte- og betennelsesprosessar og dei fleste smertestillande medikamenta (til dømes aspirin, ibuprofen og kortison) verkar ved å hindre prostaglandinsyntese (Alberts *et al.*, 1994). I alle desse nemnde systema er tyrosylradikal med på å regulere aktiviteten til og syntesehastigheita av ulike stoff.

Målet med det føreliggjande arbeidet er å kartleggje kva radikal som vert danna i N-acetyl-L-tyrosin etter bestråling ved 77 K og ved 295 K. Arbeidet inngår i eit større prosjekt der ein undersøker dei generelle strålingsmekanismene for dipeptid. Radikala vert detekterte ved hjelp av EPR- ENDOR- og EIE-spektroskopi og vert forsøkt identifiserte ved hjelp av kvantekjemiske berekningar og ulike simuleringsteknikkar.

2 Teori

Dette kapitlet gjev ein kort gjennomgang av teorien som ligg bak dei ulike eksperimentelle metodane nytta i denne oppgåva. *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) spektroskopi og *Electron Nuclear Double Resonance* (ENDOR) spektroskopi er dei to viktigaste, i tillegg til avartar som *ENDOR Induced EPR* (EIE). For ein fullstendig gjennomgang av desse teknikkane visast det til faglitteratur som til dømes *Principles of electron spin resonance* (Atherton, 1993).

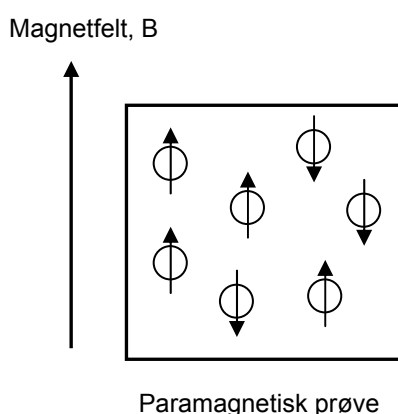
2.1 Magnetisk Resonans

2.1.1 Spinnvekselverknad i magnetisk felt

EPR spektroskopi byggjer på den erkjenninga at elektron har eit eigenspinn som i eit ytre magnetisk felt vil innrette seg (presesere) etter magnetfeltet, sjå figur 2.1.

Presesjonsfrekvensen vert kalla *Larmorfrekvensen*. Operatoren for eigenspinnet til elektronet er \hat{S} og eigenverdien til \hat{S}^2 er $S(S+1)\hbar^2$. Ved å gå ut frå at feltvektoren til magnetfeltet definerar z-retninga, $\mathbf{z} = z \cdot \mathbf{k}$, kan ein uttrykkje magnetfeltvektoren som $\mathbf{B} = B_0 \cdot \mathbf{k}$.

Projeksjonen av spinnnet i denne retninga kallast S_z , og eigenverdiane til S_z er $\hbar m_s$ der m_s kan ta verdiane $\{-S, -S+1, -S+2, \dots, S-2, S-1, S\}$. For eit elektron er $S = 1/2$ og $m_s = \pm 1/2$.



Figur 2.1: Elektronspinn i ei paramagnetisk prøve rettar seg inn etter eit påtrykt magnetfelt, B.

Klassisk kan elektronet sjåast på som ei roterande sfære med uniform ladningstettleik. Ei roterande ladning vil gje opphav til eit magnetisk moment $\boldsymbol{\mu}$, som etter klassiske utleiingar er proporsjonalt med det angulære momentet \mathbf{L} . Dersom vi erstattar \mathbf{L} med den kvantemekaniske operatoren $\hat{\mathbf{S}}$ kan det magnetiske momentet for elektron uttrykkjast:

$$\hat{\boldsymbol{\mu}}_e = -g_e \beta_e \hat{\mathbf{S}} \quad (2.1)$$

For elektron er altså det magnetiske momentet antiparallelt til spinnet. g_e er den gyromagnetiske faktor for frie elektron med ein verdi på 2,0023. Dersom ein tek med Planck sin konstant \hbar frå spinnoperatoren, kan Bohrmagnetonet β_e skrivast:

$$\beta_e = \frac{e\hbar}{2m_e} \quad (2.2)$$

Her er e elektronladinga og m_e elektronmassen. Ved innsetting vert β_e 9,2741 Am² (JT⁻¹). For skildringar av vekselverknader på mikroskopisk nivå må ein nytte postulata til kvantemekanikken og byte ut dei klassiske impuls- og posisjonsstorleikane med operatorar. I botnen ligg den tidsuavhengige Schrödingerlikninga:

$$\hat{\mathbf{H}}\Psi_n = E_n\Psi_n \quad (2.3)$$

$\hat{\mathbf{H}}$ er Hamiltonoperatoren og forventingsverdien til denne, $\langle \hat{\mathbf{H}} \rangle$, vil samsvare med energieigenverdiane E_n når Ψ_n er eigentilstandane. Klassisk vil den potensielle energien til eit magnetisk moment $\boldsymbol{\mu}$ i eit ytre magnetfelt \mathbf{B} vere gjeve som $E_{pot} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}$, men i kvantemekanikken erstattast den klassiske energien med Hamiltonoperatoren. Vekselverknaden mellom det magnetiske momentet til elektronet og eit ytre magnetfelt, $\mathbf{B} = B_0 \cdot \mathbf{k}$, kan dermed skrivast:

$$\hat{\mathbf{H}}_{Zee} = -\hat{\boldsymbol{\mu}}_e \cdot \mathbf{B} = g_e \beta_e \hat{\mathbf{S}} \cdot \mathbf{B} = g_e \beta_e B_0 S_z \quad (2.4)$$

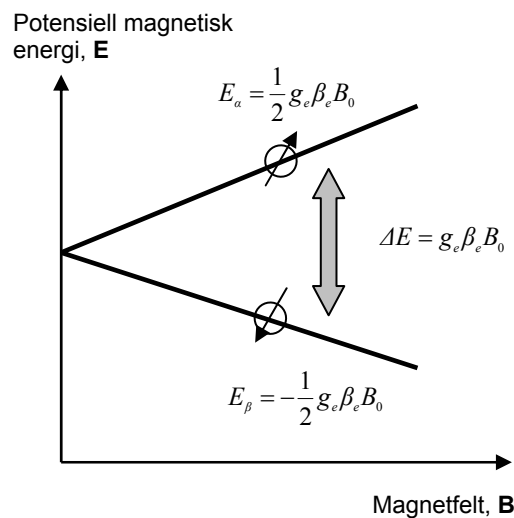
Dette kallast *Zeemanvekselverknad*. Innsetjing av $\hat{\mathbf{H}}_{Zee}$ i Schrödinger si tidsuavhengige likning gjev at energieigenverdiane for eitt fritt elektron er gjeve som:

$$E = g_e \beta_e B_0 m_s \quad (2.5)$$

Sidan $m_s = \pm 1/2$ kan elektronet vere i to ulike energitilstandar, $E_\alpha = 1/2 g_e \beta_e B_0$ for $m_s = 1/2$ og $E_\beta = -1/2 g_e \beta_e B_0$ for $m_s = -1/2$. Dersom $B_0 = 0$ vil tilstandane vere degenererte. For tilstanden der elektronet har $m_s = 1/2$ seier ein at det har ”spinn opp” og skriv tilstanden $|\alpha\rangle = |\uparrow\rangle$. For $m_s = -1/2$ kallast tilstanden ”spinn ned”, $|\beta\rangle = |\downarrow\rangle$. Differansen i energi mellom dei to tilstandane vert:

$$\Delta E = E_\alpha - E_\beta = g_e \beta_e B_0 \quad (2.6)$$

I dei fleste molekylære sambindingar vil elektrona vere para opp i molekylorbital, slik at det samla sett ikkje eksisterar noko netto magnetisk moment. Ei paramagnetisk prøve som den i figur 2.1 vil derimot ha eitt eller fleire upara elektron. Ved å tilføre energimengda ΔE frå likning 2.6, kan dei upara elektrona under rette forhold, gå frå den eine energitilstanden til den andre energitilstanden. Prøva vil då absorbere energi og denne absorpsjonen kan målast med EPR-spektroskopi. I figur 2.2 er dei to spinntilstandane med energidifferanse viste for eit fritt, upara elektron.



Figur 2.2: Energienivå som funksjon av magnetfelt for eit fritt upara elektron.

2.1.2 Overgangssannsyn og relaksasjonstider.

I EPR-spektroskopi ønskjer ein å indusere overgangar mellom spinntilstandar og dette gjerast ved å introdusere eit lite perturberande elektromagnetisk felt, skildra ved

magnetfeltkomponenten \mathbf{B}_1 , over systemet. Det perturberande feltet er i praksis eit lineært polarisert magnetfelt med retning vinkelrett på hovudmagnetfeltet:

$$\mathbf{B}_1(t) = B_1(\cos(\omega t)\mathbf{i} + \sin(\omega t)\mathbf{j}) \quad (2.7)$$

Den perturberande tidsavhengige Hamiltonoperatoren vert:

$$\hat{\mathbf{H}}_1(t) = -\hat{\boldsymbol{\mu}}_e \mathbf{B}_1(t) = g_e \beta_e \hat{\mathbf{S}} \mathbf{B}_1(t) = g_e \beta_e B_1 (S_x \cos(\omega t)\mathbf{i} + S_y \sin(\omega t)\mathbf{j}) \quad (2.8)$$

Frå kvantemekanisk tidsavhengig perturbasjonsteori kan Fermi sin gylne regel utleiast og denne skildrar sannsynet per tidseining for å indusere overgangar mellom tilstandar (Hemmer, 2000). For overgangar mellom $|\alpha\rangle$ og $|\beta\rangle$ er overgangssannsynet:

$$\Gamma_{\alpha\beta}(\omega) = \left(\frac{2\pi}{\hbar^2} \right) \left| \langle \alpha | \hat{\mathbf{H}}_1 | \beta \rangle \right|^2 \delta(\omega - \omega_{\alpha\beta}) \quad (2.9)$$

Her er $\hat{\mathbf{H}}_1$ den tidsuavhengige delen av perturbasjonen $\hat{\mathbf{H}}_1(t)$. $\hat{\mathbf{H}}_1$ kan uttrykkjast som $g_e \beta_e B_1 S_x$ og ved å erstatte S_x med heve- og senkeoperatorar, $S_x = 1/2(S_+ + S_-)$, vert;

$$\left| \langle \alpha | \hat{\mathbf{H}}_1 | \beta \rangle \right|^2 = \left(\frac{1}{2} g_e \beta_e B_1 \right)^2 \left| \langle \alpha | S_+ + S_- | \beta \rangle \right|^2 = \left(\frac{1}{2} g_e \beta_e B_1 \right)^2 \quad (2.10)$$

slik av overgangssannsynet kan skrivast:

$$\Gamma_{\alpha\beta}(\omega) = \left(\frac{2\pi}{\hbar^2} \right) \left(\frac{1}{2} g_e \beta_e B_1 \right)^2 \delta(\omega - \omega_{\alpha\beta}) \quad (2.11)$$

Det går fram av denne likninga at overgangssannsynet er identisk for emisjon og absorpsjon:

$$\Gamma_{\alpha\beta} = \Gamma_{\beta\alpha} \quad (2.12)$$

Deltafunksjonen til Dirac, $\delta(\omega - \omega_{\alpha\beta})$ i likning 2.11, viser at det berre kan finne stad stimulerte overgangar mellom $|\alpha\rangle$ og $|\beta\rangle$ når:

$$\hbar\omega = \hbar\omega_{\alpha\beta} = E_\alpha - E_\beta = g_e \beta_e B_0 \quad (2.13)$$

Dette er den sokalla *resonansføresetnaden*. Det vil vere to moglege måtar å oppfylle denne likninga på og dermed få ein EPR-absorpsjon. Ein kan halde strålingsfrekvensen konstant og sveipe over eit magnetfeltområde, eller ein kan halde magnetfeltet konstant og sveipe over eit

frekvensområde. På grunn av tekniske årsaker nyttast vanlegvis førstnemnde metode. Magnetfeltverdien der systemet absorberar energi vert:

$$B_0 = \frac{\hbar \omega_{\alpha\beta}}{g_e \beta_e} \quad (2.14)$$

Likning 2.11 viser og at overgangssannsynet $\Gamma_{\alpha\beta}$ er proporsjonalt med $|B_1|^2$, altså energitettleiken til det perturberande elektromagnetiske feltet. Det vil seie at dersom ein aukar effekten til feltet, vil intensiteten til absorpsjonssignalet auke. Men vert effekten tilstrekkeleg høg vil systemet kunne gå i metting (sjå kapittel 2.1.3) og EPR-signalet vil forsvinne.

2.1.3 Spinnpopulasjon og relaksasjonstider

Elektron er fermion og Fermi-Dirac-statistikk gjev sannsynet for at eit fermion skal vere i ein tilstand Ψ_n med energi E_n :

$$p_n(E_n) = \frac{1}{e^{E_n/kT} + 1} \approx e^{-E_n/kT} \quad (2.15)$$

Her er T den absolutte temperaturen og k er Boltzmannkonstanten. Ved termisk likevekt vil forholdet mellom talet på elektron i den øvre tilstanden, n_α , og talet på elektron i den nedre tilstanden, n_β , vere gjeve ved:

$$\frac{n_\alpha}{n_\beta} = \frac{p(E_\alpha)}{p(E_\beta)} = \frac{e^{-E_\alpha/kT}}{e^{-E_\beta/kT}} = e^{-(E_\alpha - E_\beta)/kT} = e^{-g_e \beta_e B_0/kT} < 1 \quad (2.16)$$

Denne likninga viser at det ved termisk likevekt er fleire elektron i $|\beta\rangle$ -tilstanden enn i $|\alpha\rangle$ -tilstanden og at populasjonsforskjellane vil auke med aukande magnetfelt. Når systemet mottek energi som svarar til at resonansføresetnaden i likning 2.13 vert oppfylt, vil sannsynet for induserte overgangar mellom $|\alpha\rangle$ og $|\beta\rangle$ vere identisk. Men sidan det ved termisk likevekt er fleire elektron i $|\beta\rangle$ - enn i $|\alpha\rangle$ -tilstanden vil det ved resonans likevel skje ein netto absorpsjon av energi. Det er denne absorpsjonen ein ønskjer å registrere i EPR.

Utan nokon andre vekselverknadar vil populasjonsforskjellen mellom $|\alpha\rangle$ og $|\beta\rangle$ raskt verte utjamna. Systemet vert metta og EPR signalet vil døyt ut. Men i følgje klassisk termodynamikk vil eit system som er i kontakt med eit varmereservoar og som blir ført ut av likevekt, prøve å fornye likevekta ved å utveksle energi med reservoaret. I krystallar kan ein tenke seg at spinnnet er bunde i det krystalliske gitteret og at reservoaret er representert ved dei

atomære omgjevnadane til spinnet. Spinnsystemet vil motvirke ei utjamning av populasjonsforskjellen ved å utveksle energi med ”gitteret” og denne prosessen kallast *spinn-gitter-relaksasjon*. Energiutvekslinga skjer i form av spontane, ikkje-radiative overgangar mellom spinnivåa. Sidan $n_\beta > n_\alpha$ må sannsynet for ein spontan overgang frå $|\beta\rangle$ til $|\alpha\rangle$, W_\uparrow , vere større enn sannsynet for ein spontan overgang frå $|\alpha\rangle$ til $|\beta\rangle$, W_\downarrow . Det totale spontane overgangssannsynet kan skrivast:

$$W = W_\uparrow + W_\downarrow = \frac{1}{T_1} \quad (2.17)$$

T_1 kallast *spinn-gitter-relaksasjonstid* og denne er eit mål på den gjennomsnittlege levetida til eit spinn i ein gjeven tilstand. Som følgje av spinn-gitter-relaksasjon vil populasjonsforskjellane mellom $|\alpha\rangle$ og $|\beta\rangle$ oppretthaldast og EPR-absorpsjonen vil vere konstant under føresetnad av at effekten ikkje vert så høg at relaksasjonsprosessane ikkje klarar å oppretthalde populasjonsforskjellane mellom tilstandane. Dersom dette er tilfellet vil systemet verte metta.

Uvisserelasjonen til Heisenberg;

$$\Delta E \Delta t \geq \hbar \quad (2.18)$$

viser at kor nøyaktig det er mogleg å måle energien til ein kvantemekanisk tilstand (ΔE) vil avhenge av levetida til tilstanden (Δt). For spektroskopiske målingar vil ei slik uvisse i energien føre til at ein ikkje målar energiabsorpsjon berre ved ein enkelt frekvens $\omega_{\alpha\beta}$, men og i eit visst intervall rundt denne frekvensen. EPR-absorpsjonskurva får altså ei endeleg linjebreidde, $\Delta\omega$. Ei omformulering av likning 2.18 gjev $\Delta\omega \geq 1/\tau$, der τ er eit uttrykk for levetida. I magnetisk resonans kan levetida tilnærmast med spinn-gitter-relaksasjonstida T_1 , slik at:

$$\Delta\omega \geq \frac{1}{T_1} \quad (2.19)$$

Denne likninga viser at dersom T_1 vert tilstrekkeleg kort, vil linjebreidda kunne bli så stor at det ikkje er mogleg å detektere EPR-absorpsjonen.

Ein annan relaksasjonsprosess som har innverknad på linjebreidda til EPR-absorpsjonssignalet, er *spinn-spinn-relaksasjon*. Denne er karakterisert ved spinn-spinn relaksasjonstida T_2 . I system med fleire spinn vil kvart av spinna oppleve lokale felt satt opp av andre spinn. Desse

ulike lokale feltverdiane fører til ei spreiding om Larmorfrekvensen for dei ulike spinna. Ei spreiding i frekvensar vil vidare føre til ei auke i linjebreidda til EPR-absorpsjonssignalet.

2.2 Upara elektron i molekylære omgjevnadar

I røynda vil ikkje elektron eksistere einslege og skilde frå andre elektron og kjernar, men dei vil derimot oppleve innbyrdes vekselverknadar i tillegg til ulike ytre påverknadar.

Hamiltonoperatoren frå kapittel 2.1 må utvidast for å ta omsyn til alle vekselverknadane upara elektron i molekylære omgjevnadar opplever.

2.2.1 Spinn-Hamiltonoperator

Den totale Hamiltonoperatoren til eit molekylært system vil innehalde ledd for kinetisk og potensiell energi, samt ledd som skildrar spinnvekselverknadar mellom magnetfelt, elektron og kjernar. I EPR er det spinnoverganger som er av interesse og for eit molekylært system kan spinndelen av Hamiltonoperatoren skrivast:

$$\hat{H}_{spinn} = \beta_e \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{g}} \cdot \mathbf{B} - g_N \beta_N \mathbf{I} \cdot \mathbf{B} + \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{A}} \cdot \mathbf{I} + \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{D}} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{I} \cdot \hat{\mathbf{P}} \cdot \mathbf{I} \quad (2.20)$$

Dei ulike ledda representerar ulike spinn-vekselverknadar og i utgangspunktet er det dei tre første ledda; Zeemanleddet, kjerne-Zeemanleddet og hyperfinvekselverknaden mellom elektron og kjerne, som er viktige for denne oppgåva. Elektron-elektron dipoltermen i det nest siste leddet skildrar magnetiske vekselverknadar mellom to upara elektronspinn og vil berre opptre i system der $\mathbf{S} \geq 1$. Det siste leddet i likning 2.20 tek omsyn til ei kvadrupolkopling mellom inhomogene elektriske felt og kjernar med $\mathbf{I} \geq 1$. Slike kjernar vil ha ei ladningsfordeling som ikkje er sfærisk.

Zeemanvekselverknad for elektron

Det første leddet av spinn-Hamiltonoperatoren i likning 2.20, Zeemantermen, skildrar vekselverknaden mellom elektronspinn \mathbf{S} og eit ytre magnetfelt \mathbf{B} . Upara elektron i ein gjeven molekylorbital kan, i tillegg til eigenspinnet \mathbf{S} , ha eit residualt banespinn \mathbf{L} . Baneimpulsmomentet til

elektronet vil då vekselverke med elektronspinnnet og gje opphav til ei sokalla spinnbanekopling:

$$\hat{\mathbf{H}}_{LS} = \lambda \cdot \mathbf{L} \cdot \mathbf{S} \quad (2.21)$$

λ kallast spinnbanekoplingskonstanten og den avhenger av atom- og orbitaltype. Ved å utvikle spinnbanekoplinga til andre orden finn ein at den gyromagnetiske faktoren g_e i likning 2.4, må erstattast med ein $\hat{\mathbf{g}}$ -tensor^{*}:

$$\hat{\mathbf{H}}_{Zee} = \beta_e \cdot \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{g}} \cdot \mathbf{B} \quad (2.22)$$

$\hat{\mathbf{g}}$ -tensoren er ei symmetrisk 3×3 -matrise, som for eitt enkelt atom har matriseelement

$$g_{ij} = g_e \delta_{ij} - 2\lambda \sum_{n \neq 0} \frac{\langle 0 | L_i | n \rangle \langle n | L_j | 0 \rangle}{E_n - E_0} \quad (2.23)$$

Indeksane i og j viser til dei kartesiske koordinatane x , y og z . Kroneckerdeltaet δ_{ij} syner at g_e berre gjev bidrag når $i = j$ og λ er spinnbanekoplingskonstanten. E_n er energien til den n 'te eksiterte elektrontilstanden og $|n\rangle$ er den tilhøyrande romlege bølgefunksjonen. For eit molekylært system vil det upara elektronet gjerne vere delokalisert over fleire kjernar og uttrykket for $\hat{\mathbf{g}}$ -tensoren vil då få ei meir kompleks form enn uttrykket i likning 2.23 (Stone, 1963).

g -verdien er ein anisotrop storleik. Det vil seie at den kan variere med orientering i forhold til eit ytre magnetfelt. Den g -verdien ein observerar for ei generell orientering i magnetfeltet er:

$$g(l, m, n) = \left(l^2 g_{xy}^2 + m^2 g_{yy}^2 + n^2 g_{zz}^2 + 2lm g_{xy}^2 + 2ln g_{xz}^2 + 2mn g_{yz}^2 \right)^{1/2} \quad (2.24)$$

l , m og n er cosinus til vinklane mellom det ytre magnetfeltet og aksane i eit ortogonalt referansesystem. g_{xx}^2, g_{xy}^2 , osv. er tensorelementa til $\hat{\mathbf{g}}^2$. Dersom ein målar $g(l, m, n)$ for ulike krystallorienteringar i eit ekstern magnetfelt, kan dei ulike tensorelementa til $\hat{\mathbf{g}}^2$ bestemmast. Ei diagonalisering av $\hat{\mathbf{g}}^2$ gjev prinsipalelement[†] med tilhøyrande eigenvektorar, der eigenvektorane definerar prinsipalaksesystemet.

^{*} Ein tensor er ein storleik som har ulik verdi i ulike retningar. Tensorane i denne oppgåva kan vanlegvis skildrast med 3×3 -matriser.

[†] Prinsipalelement er diagonalledda i ei diagonalisert matrise.

Zeemanvekselverknad for kjernar

Analogt med elektron har kjernar eigenpinn \mathbf{I} som gjev opphav til eit magnetisk moment,

$\boldsymbol{\mu}_N = g_N \beta_N \mathbf{I}$. g_N er ein storleik som vanlegvis er konstant for kvar enkelt kjernetype.

Kjernemagnetonet β_N kan uttrykkjast, $\beta_N = e\hbar/2m_p$ når \hbar er trekt inn frå spinnoperatoren.

Det magnetiske kjernemomentet vil vekselverke med eit ytre påtrykt magnetfelt og denne vekselverknaden leier til kerne-Zeemantermen, vist som ledd to i likning 2.20:

$$\hat{\mathbf{H}}_{N-Zee} = -\boldsymbol{\mu}_N \cdot \mathbf{B} = -g_N \beta_N \mathbf{I} \cdot \mathbf{B} \quad (2.25)$$

Når retninga til magnetfeltet definerar z-aksen vert $\hat{\mathbf{H}}_{N-Zee} = -g_N \beta_N B_0 I_Z$ med

energieigenverdiar $E = g_N \beta_N B_0 m_I$. Kjernar har null eller halvtallig kjernespin

($I = 0, 1/2, 1, 3/2, \dots$) og m_I kan ta verdiane $(-I, -I+1, \dots, I-1, I)$, til saman $2I+1$ verdier.

For eit proton er $I = 1/2$ og $m_I = \pm 1/2$. Som i tilfellet med elektron kan ein indusere overgangar mellom kjernespinnivå ved å tilføre ei energimengde som svarar til energidifferansen mellom dei ulike kjernespinnivåa.

Hyperfinvekselverknad

Det tredje leddet i spinn-Hamiltonoperatoren representerar dei magnetiske vekselverknadane mellom det upara elektronspinn og kjernane. Sidan kjernar har eit magnetisk moment vil dei setje opp lokale magnetfelt som vil vekselverke med elektronspinn. Hyperfintensoren $\hat{\mathbf{A}}$ viser kor sterke desse vekselverknadane er og den kan skildrast i to ledd; eit isotropt ledd (Fermis kontaktvekselverknad) og eit anisotropt ledd (dipol-dipol vekselverknad).

Det isotrope kontaktvekselverknadsleddet bidreg berre dersom det er eit visst sannsyn for at elektronet kan finnast på kjernen sin plass. I praksis vil dette seie at elektronet er i ein s-orbital sidan desse ikkje har noder på senteret til kjernen. Kontaktvekselverknaden mellom elektron og kjerne gjev operatoren $\hat{\mathbf{H}}_k = a_{iso} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{I}$, der a_{iso} er den isotrope koplingskonstanten. For hydrogenatomet er denne:

$$a_{iso} = \frac{2}{3} \mu_0 g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(r_N)|^2 \quad (2.26)$$

Her er $\psi(r)$ tilstandsfunksjonen for eit elektron og $|\psi(r_N)|^2$ gjev sannsynet for å finne elektronet på kjernen sin plass. μ_0 er permeabilitetskonstanten.

På grunn av sine magnetiske moment, kan elektron og kjerner sjåast på som dipolar. Dersom ein i tillegg går ut frå at utstrekninga til dipolane er lita samanlikna med avstanden mellom dei, kan elektron-kjerne-vekselverknadane behandlast som vekselverknadar mellom punktdipolar. Dette gjev eit anisotropt bidrag til hyperfintensoren. Sannsynet for at elektronet skal vere på plassen til kjernen må vere lik null. Det vil i praksis seie at elektronet er i ein p-, d-, eller f-orbital. Hamiltonoperatoren for denne type vekselverknadar er $\hat{\mathbf{H}}_{dd} = \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{A}}^0 \cdot \mathbf{I}$, der $\hat{\mathbf{A}}^0$ er ei symmetrisk matrise med matriseelement:

$$A_{ij}^0 = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{3ij - r^2 \delta_{ij}}{r^5} \right\rangle \quad (2.27)$$

r representerar her avstanden mellom dipolane. Summen av diagonalledda til denne matrisa er null og vi seier at matrisa er traselaus. Sidan matrisa også er symmetrisk vil den alltid kunne diagonaliserast ved val av eit passende aksesystem. Klammeparantesen i likning 2.27, viser til ein integrasjon over den romlege fordelinga til elektronet. Ved å trekke saman $\hat{\mathbf{H}}_k$ og $\hat{\mathbf{H}}_{dd}$, samt innføre $A_{ij} = a_{iso} \delta_{ij} + A_{ij}^0$, kan den totale Hamiltonoperatoren for hyperfinvekselverknad skrivast:

$$\hat{\mathbf{H}}_{hyp} = \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{A}} \cdot \mathbf{I} \quad (2.28)$$

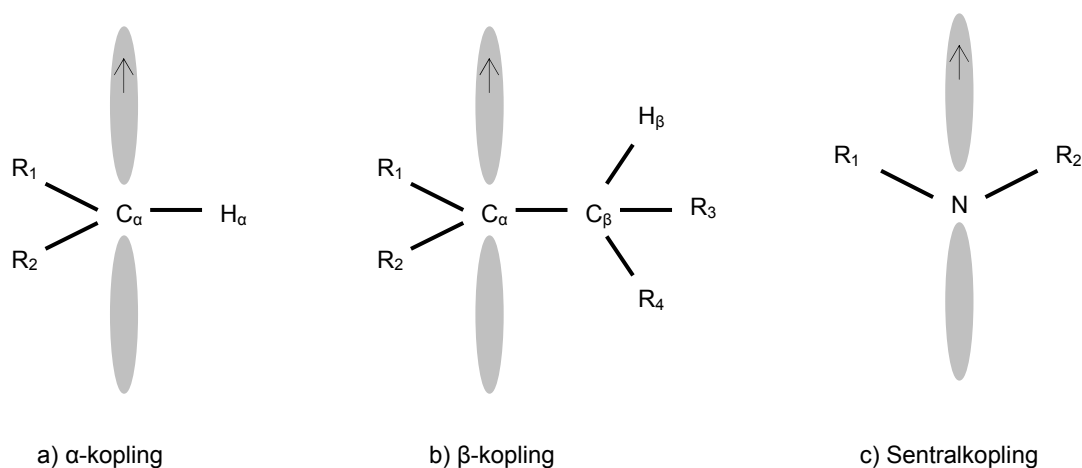
$\hat{\mathbf{A}}$ kallast hyperfinkoplingstensoren. Sidan $\hat{\mathbf{A}}^0$ er symmetrisk og traselaus vil det seie at trasen til $\hat{\mathbf{A}}$ er $3a_{iso}$. Analogt med $\hat{\mathbf{g}}$ let matrisa $\hat{\mathbf{A}}$ seg bestemme eksperimentelt og ved å diagonalisere den kan ein finne prinsipalelementa. Kjenner ein prinsipalelementa kan ein og finne a_{iso} sidan $a_{iso} = (1/3)Tr(\hat{\mathbf{A}})$.

Av likning 2.26 og 2.27 ser vi at både det isotrope og det anisotrope bidraget til hyperfinvekselverknaden avheng av g_N , som varierar frå kjernetype til kjernetype. I EPR/ENDOR/EIE-spektroskopi er det vanleg å studere vekselverknadar mellom upara spinn og proton (1H) i krystallar dyrka i H_2O . Det viser seg at proton som er bunde til nitrogen- eller oksygenatom let seg skifte ut med deuterium (2H) i løysingar av D_2O . Sidan proton har $g_{^1H} \approx 5,585$ medan deuterium har $g_{^2H} \approx 0,857$, vil ei kopling til deuterium vere mykje mindre enn ei tilsvarende protonkopling. I EPR-spekteret frå krystallar dyrka i D_2O vil dei små koplingane til deuterium ofte bli borte fordi koplingane ikkje let seg løyse opp i spekteret. I ENDOR vil koplingane til deuteriumkjerner verte tilsvarende små og frekvensane til resonanslinjene vil avhenge av frideuteriumfrekvensen, sjå kapittel 2.3.2.

2.2.2 Koplingstypar

Som tidlegare nemnt går ein ut frå at $\hat{\mathbf{g}}$ -tensoren og hyperfinkoplingstensoren $\hat{\mathbf{A}}$ frå kapittel 2.2.1 er symmetriske, slik at ein ved diagonalisering kan finne prinsipalverdiar med tilhøyrande eigenvektorar. Desse vil igjen vere relaterte til fordelinga av elektronspinn over molekylet og til den geometriske strukturen innbyrdes i molekylet, med andre ord til radikalstrukturen. I eit einkrystalleksperiment vert krystallen rotert i eit ytre magnetfelt om sine krystallografiske aksar og ESR/ENDOR-spekter vert teke opp for kvar orientering. Dei ulike splittingskonstantane a_i målast i kvart spekter og nyttast til å utleie tensorelementa til $\hat{\mathbf{A}}$. Dersom EPR-spektra ikkje er for komplekse kan ein og måle tyngdepunktet g_i til resonanslinjene for ulike orientering i magnetfeltet og frå desse målingane kan ein bestemme $\hat{\mathbf{g}}$ -tensoren.

Hyperfinkoplinga avheng av avstandar mellom ulike atom i eit molekyl og bindingsstrukturen i molekylet. Det vert difor definert ulike koplingstypar som har ulike hyperfinkoplingstensorar. I figur 2.3 er tre vanlege koplingstypar viste, ei a) α -kopling, b) β -kopling og c) sentralkopling. For alle desse koplingane går ein ut frå at sentralatomet er sp^2 -hybridisert. Det vil seie at tre sp^2 -orbital ligg separerte med ein vinkel på 120 grader i same plan, medan den fjerde orbitalen, $2p_z$, står ortogonalt på planet. Ein går ut frå at det upara elektronet er i $2p_z$ -orbitalen.



Figur 2.3: Tre ulike koplingstypar, a) α -, b) β - og c) sentralkopling. I alle desse tre tilfella går ein ut frå at sentralatomet er sp^2 -hybridisert og at det upara elektronspinnnet er i $2p_z$ -orbitalen. R markerer sidegrupper.

α -kopling

Figur 2.3 a) viser eit tilfelle der det upara spinnet i $2p_z$ på det sentrale karbonatomet (C_α) vekselverkar med spinnet til eit hydrogenatom (H_α) bunde direkte til karbonatomet. Denne vekselverknaden gjev opphav til ei α -kopling. Ei slik kopling har ein stor anisotrop komponent med eigenverdiar $(a_d^\alpha, 0, -a_d^\alpha)$. Det isotrope bidraget til α -koplinga er negativt og proporsjonalt med spinntettleiken i $2p_z$ -orbitalen. McConnells likning estimerer isotropbidraget som (McConnell og Chestnut, 1958):

$$a_{iso}^\alpha = Q_{CH}^H \rho^\pi \quad (2.29)$$

Her er Q_{CH}^H ein negativ konstant som avheng av ladning og geometri rundt C_α med ein absoluttverdi mellom 2.3-2.9 mT (Bernhard, 1981). *Spin-exchange* vekselverknad mellom det upara elektronet og elektronspinn i C_α - H_α -bindinga gjer at sannsynet er større for at eit elektron i $|\beta\rangle$ -tilstanden skal vere på protonet sin plass, enn at eit elektron i $|\alpha\rangle$ -tilstanden skal vere det. Dermed vert det induisert negativ spinntettleik i $1s$ -orbitalen til H_α som forklarar det negative forteiknet til a_{iso}^α . Det viser seg at $a_{iso}^\alpha \cong -2a_d^\alpha$, slik at prinsipalelementa til den totale hyperfinkoplingstensen for ei α -kopling tilnærma kan skrivast:

$$\begin{pmatrix} A_{\min} \\ A_{\text{int}} \\ A_{\text{maks}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{iso}^\alpha + a_d^\alpha \\ a_{iso}^\alpha \\ a_{iso}^\alpha - a_d^\alpha \end{pmatrix} \approx \begin{pmatrix} -a_d^\alpha \\ -2a_d^\alpha \\ -3a_d^\alpha \end{pmatrix} \quad (2.30)$$

Prinsipalverdien med minst absoluttverdi A_{\min} har eigenvektor t_{\min}^α , som ligg nær retninga til C_α - H_α -bindinga. Den intermediære prinsipalverdien A_{int} har eigenvektor t_{int}^α , som ligg nær retninga til $2p_z$ -orbitalen på C_α . Prinsipalverdien med størst absoluttverdi A_{maks} har eigenvektor t_{maks}^α , med retning normalt på dei to andre eigenvektorane.

Spinntettleiken på det sentrale karbonatomet kan også bestemast frå dipolbidraget til hyperfinkoplingstensen (Gordy, 1980):

$$a_Z = A_{\min} - a_{iso}^\alpha = Q_Z^{\text{dip}} \rho^\pi \quad (2.31)$$

I følge Bernhard (1984) gjev denne likninga ein meir påliteleg verdi for spinntettleiken på det sentrale karbonatomet enn likning 2.29. a_Z er den mest positive anisotrope verdien til tensoren og Q_Z^{dip} er ein konstant som empirisk er bestemt til 38,7 MHz.

β-kopling

I figur 2.3 b) vekselverkar det upara elektronet med eit hydrogen i β-posisjon. Eit hydrogenatom H_β seiast å vere i β-posisjon dersom det er bunde til eit karbonatom C_β , som igjen er bunde til det sentrale C_α -karbonatomet der det upara elektronet er lokalisert. Koplinga mellom H_β og C_α kallast ei β-kopling. Sidan avstanden mellom β-protonet og det upara elektronet er relativt stor i ei slik binding, kan ein approksimere vekselverknaden mellom dei som ein punktdipolveksselverknad. Det anisotrope bidraget til β-tensoren vil då få eigenverdiar $(2a_d^\beta, -a_d^\beta, -a_d^\beta)$. Storleiken a_d^β er omvend proporsjonal med avstanden r^3 mellom H_β og det upara spinnet:

$$a_d^\beta = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \beta_e g_N \beta_N \frac{\rho^\pi}{r^3} \quad (2.32)$$

Den relativt store avstanden mellom H_β og C_α fører til at det anisotrope bidraget vert heller lite. Det isotrope bidraget til β-tensoren kan derimot verte forholdsvis stort dersom kjernen H_β ikkje ligg i nodalplanet til $2p_z$ -orbitalen til C_α . Dersom $2p_z$ -orbitalen overlappar s-orbitalen til H_β , kan det upara elektronspinnnet på C_α vekselverke direkte med spinnet på H_β . Denne effekten kallast *hyperkonjugasjon* og er hovudbidraget til den isotrope koplingskonstanten til ei β-kopling, a_{iso}^β . Storleiken til a_{iso}^β kan uttrykkjast (Heller og McConnell, 1960):

$$a_{iso}^\beta = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta) \rho^\pi \quad (2.33)$$

Dihedralvinkelen θ er vinkelen mellom planet utspent av C_α - C_β - H_β og planet utspent av C_α - C_β -bindinga og z-aksen. Denne bestemmer altså kor stor overlapp det er mellom $2p_z$ -orbitalen til C_α og s-orbitalen til H_β . I tillegg til dihedralvinkelen avheng a_{iso}^β av spinntettleiken ρ^π på C_α . B_0 og B_2 er konstantar som varierar med type kjerne, bindingsavstandar og konformasjonar (Bernhard, 1981). Den totale hyperfintensoren for ei β-kopling er tilnærma aksialsymmetrisk og prinsipalverdiane er på forma $(a_{iso}^\beta + 2a_d^\beta, a_{iso}^\beta - a_d^\beta, a_{iso}^\beta - a_d^\beta)$. For θ nær 0° vil den største prinsipalverdien ha eigenvektor t_{maks}^β , med nær same retning som C_α - H_β . Når θ nærmar seg 90° , vil eigenvektoren t_{maks}^β nærme seg retninga til C_β - H_β .

Sentralkopling

I sentralkoplinga vist i figur 2.3 c), vekselverkar det upara elektronet i $2p_z$ -orbitalen med kjernen til det atomet elektronspinn er lokalisert på. Dipoltensoren er aksialsymmetrisk med prinsipalelement $(2a_d, -a_d, -a_d)$ der:

$$a_d = \frac{2}{5} g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{1}{r^3} \right\rangle \rho^\pi = a_d^0 \rho^\pi \quad (2.34)$$

a_d avheng slik av avstand r , spinntettleik ρ^π og vil variere med type kjerne (g_N). Nitrogen har ein verdi $a_d^0 \sim 49$ MHz. Spinnpolarisering mellom 2p- og 2s-orbitala induserar spinntettleik på kjernen sin plass og gjev opphav til det positive isotrope bidraget i sentralkoplinga.

2.3 Resonansteknikkar

2.3.1 Electron Paramagnetic Resonance (EPR)

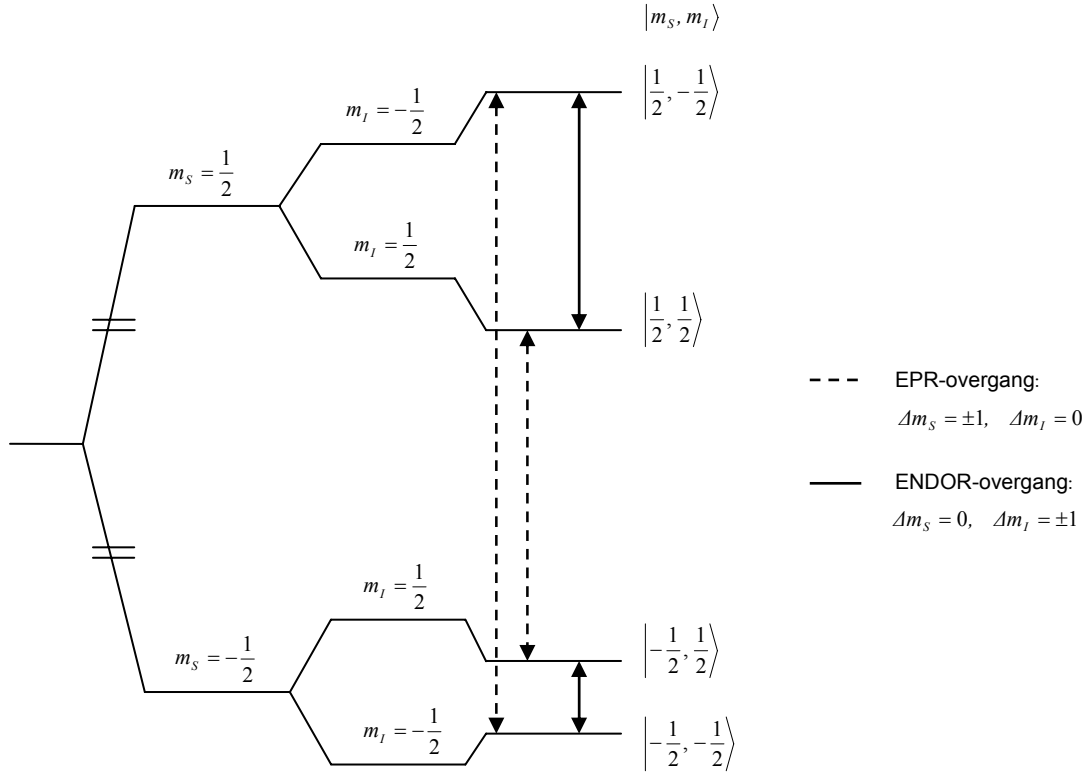
Ved å ta utgangspunkt i vekselverknaden mellom eit upara elektron med eigenspinn $S = 1/2$ og ei kjerne med kjernespin $I = 1/2$ kan ein enkelt skildre hovudtrekka i eit EPR-eksperiment. Dersom ein ser bort frå elektron-elektron dipoltermen og kvadrupoltermen i likning 2.20 og i tillegg går ut frå at $\hat{\mathbf{g}}$ og $\hat{\mathbf{A}}$ er isotrope, kan spinn-Hamiltonoperatoren uttrykkjast:

$$\hat{\mathbf{H}} = g_e \beta_e \mathbf{B} \cdot \mathbf{S} - g_N \beta_N \mathbf{B} \cdot \mathbf{I} + a \mathbf{S} \cdot \mathbf{I} \quad (2.35)$$

Ved å nytte standard pertubasjonsteori til første orden og sette $\mathbf{B} = B \cdot \mathbf{k}$, vert energieigenverdiane:

$$E_n = m_S g_e \beta_e B - m_I g_N \beta_N B + a m_S m_I \quad (2.36)$$

m_S og m_I kan begge ta verdiane $\pm 1/2$ slik at ein i dette tilfellet får fire ulike eigenverdiar. I figur 2.4 er det vist eit energinivådiagram for $1/2|a| > g_N \beta_N B$ og $a < 0$. Ein EPR-overgang er karakterisert ved $\Delta m_S = \pm 1$ og $\Delta m_I = 0$ og dei stipla pilene i figur 2.4 markerer dei to moglege EPR-overgangane i dette tilfellet.



Figur 2.4: Energienivådiagram for eit system med eit elektronspinn $S = 1/2$ og eitt kjernespin $I = 1/2$. Det er gått ut frå at $1/2|a| > g_N \beta_N B$ og at $a < 0$. Dei stipla pilene markerer EPR-overgangar der $\Delta m_S = \pm 1$ og $\Delta m_I = 0$. ENDOR-overgangane er viste med heiltrekte piler for $\Delta m_S = 0$ og $\Delta m_I = \pm 1$. Dobbeltstrekane markerer at skalaen ikkje er reell sidan $1/2 g_e \beta_e B \gg 1/2 g_N \beta_N B$.

Ved å innføre $h\nu_e = g_e \beta_e B$ og $h\nu_N = g_N \beta_N B$ i likning 2.36, kan resonansfrekvensane for dei to overgangane skrivast:

$$\begin{aligned} h\nu_1 &= h\nu_e + \frac{1}{2}|a| \\ h\nu_2 &= h\nu_e - \frac{1}{2}|a| \end{aligned} \quad (2.37)$$

Sidan vi eksperimentelt varierar magnetfeltet i staden for frekvensen, omformar ein gjerne likningane i 2.37 til å uttrykkje ved kva magnetfeltverdi resonansane førekjem:

$$\begin{aligned} g_e \beta_e B_1 &= h\nu_1 = h\nu_e + \frac{1}{2}|a| \Leftrightarrow B_1 = \frac{h\nu_e + 1/2|a|}{g_e \beta_e} \\ g_e \beta_e B_2 &= h\nu_2 = h\nu_e - \frac{1}{2}|a| \Leftrightarrow B_2 = \frac{h\nu_e - 1/2|a|}{g_e \beta_e} \end{aligned} \quad (2.38)$$

Ved dei to magnetfeltverdiane B_1 og B_2 vil altså systemet absorbere energi og dette resulterer i to resonanslinjer i EPR-spekteret. Resonanslinjene vil ha lik intensitet og vere separerte med $a = (B_2 - B_1)$. g -verdien gjev tyngdepunktet i spekteret og har verdi $g = 2h\nu_e/(\beta_e(B_1 + B_2))$. EPR-spekteret gjev ingen informasjon om kva for ein av overgangane $\Delta m_s = 1$ eller $\Delta m_s = -1$ som gjev dei ulike linjene, noko som medfører at forteiknet til hyperfinsplittingskonstanten a ikkje kan bestemmast ut frå spektra.

2.3.2 Electron Nuclear DOuble Resonance (ENDOR)

Til no har vi snakka om grunnleggjande EPR-spektroskopi der ein detekterer elektronspinnovergangar i eit ytre magnetfelt ved å introdusere eit perturberande mikrobølgjefelt. Men EPR-spektra er ofte kompliserte og dårleg oppløyste. I faste stoff er linjebreidda til eit EPR-signal hovudsakleg bestemt av spinn-gitter-relaksasjonstida (sjå kapittel 2.1.3). Er denne kort, vil linjebreidda verte brei og hyperfinkoplingar av mindre art vert uoppløyste og vanskelege å identifisere. Dersom stoffet i tillegg inneheld fleire radikal med g -verdiar i same storleiksorden, vil resonanslinjene til dei ulike radikala kunne overlappe og slik komplisere spekteret.

ENDOR løyser delar av desse problema ved å mette EPR-overgangar og i staden indusere overgangar mellom kjernespinnnivå. I tillegg til oppsettet for EPR trengs eit radiofrekvent elektromagnetisk felt (rf-felt) i MHz-området. Hovudmagnetfeltet låsast til ein EPR-overgang, til dømes den representert ved overgang mellom $|m_s, m_I\rangle$ -tilstandane $|1/2, 1/2\rangle$ og $|-1/2, 1/2\rangle$. Overgangen mettast så ved hjelp av mikrobølgjefeltet, slik at populasjonsforskjellen mellom dei to nivåa delvis vert jamna ut og EPR-absorpsjonssignalet vert redusert. Ein sveipar så rf-feltet til feltet oppnår ein energi som samsvarar energidifferansen mellom to kjernespinnnivå, til dømes energidifferansen mellom $|1/2, -1/2\rangle$ og $|1/2, 1/2\rangle$. Denne overgangen vert så metta slik at populasjonsforskjellen mellom overgangane vert utjamna. Resultatet er at vi får att ein populasjonsforskjell mellom EPR-tilstandane $|1/2, 1/2\rangle$ og $|-1/2, 1/2\rangle$ slik at EPR-signalet delvis vert gjenoppretta. For ENDOR gjeld utvalsreglane $\Delta m_s = 0$ og $\Delta m_I = \pm 1$. Situasjonen i figur 2.4, der $|a|/2 > h\nu_N$, vil gje to resonanslinjer i ENDOR spekteret sentrert om $|a|/2$ med resonansfrekvensar:

$$v_{\mp} = \left| \frac{1}{2}a \pm v_N \right| \quad (2.39)$$

Dersom $|a|/2 < h\nu_N$, vil ENDOR-linjene vere sentrerte om ν_N og resonansfrekvensane vil vere gjeve ved $\nu_{\pm} = |\nu_N \pm 1/2 a|$. ν_N er resonansfrekvensen til frie kjernar i systemet og denne frekvensen vil generelt vere ulik for ulike kjernar. For proton (1H) vert den kalla *friprotonfrekvensen*, ν_P , medan den for deuterium (2H) vert kalla *frideuteriumfrekvensen*, ν_D .

Sidan kjernespin har lengre relaksasjonstider enn elektronspinn, vil linjebreiddene i ENDOR generelt vere smalare enn EPR-linjebreiddene. Dette gjer det enklare å måle hyperfinsplittingsar presist, i tillegg til at det gjev ei betre spektral oppløysing. Koplingar med små hyperfinsplittingsar vil i EPR ofte vere uoppløyste slik at dei berre medverkar til å auke linjebreiddene. I ENDOR vil ein kunne observere slike små koplingar som separate resonanslinjer sentrert om friprotonfrekvensen. I tillegg vil ENDOR-spekteret normalt bestå av færre linjer enn eit EPR-spekter sidan ekvivalente proton berre gjev opphav til to ENDOR-resonanslinjer, medan ein i EPR vil få ein multipla struktur. Kvart ENDOR-spekter vil vere karakteristisk for den EPR-linja som vert metta. Ved å mette ulike EPR-linjer kan ein skilje radikal som samstundes er tilstades i EPR-spekteret.

2.3.3 ENDOR Induced EPR (EIE)

I EIE låsar ein det radiofrekvente feltet på ei ENDOR-resonanslinje, det vil seie ein m_I -overgang og settar denne overgangen med rf-effekt slik at populasjonsforskjellen mellom kjernespinnivåa vert utjamna. Deretter vert magnetfeltet sveipt og når magnetfeltet har ein energi som samsvarar med energidifferansen til ein EPR-overgang som har felles energinivå med den metta m_I -overgangen, vil populasjonen på kjernespinnivåa endre seg noko som medfører at intensiteten til den undersøkte ENDOR-linja vert endra. EIE-spekteret vert dermed eit EPR-absorpsjonsliknande spekter som er spesifikt for den EPR-linja hovudmagnetfeltet opphavleg er låst til. ENDOR-linjer som stammar frå same radikal vil teoretisk gje identiske EIE-spekter. EIE kan slik nyttast til å sortere ENDOR-linjer til bestemte radikal og til å bestemme kor mange radikal som gjev bidrag i EPR-spekteret.

I praksis må frekvensen til det radiofrekvente feltet varierast når magnetfeltet varierast, for at resonansføresetnaden skal vere oppfylt. Dette av di resonansfrekvensen til ei ENDOR-linje er gjeve ved $\nu_{\pm} = |1/2 a \pm \nu_N|$, der $\nu_N \propto B_0$.

3 Material og metodar

3.1 Krystallar, site-splitting og Schonlands tvitydnad

I dette EPR/ENDOR-studiet er det nytta einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin. Krystallane vart framstilte av pulver, orienterte langs ønska rotasjonsakse og bestrålte før dei vart undersøkte spektroskopisk.

Den minste eininga som kan representere dei makroskopiske eigenskapane til ein krystall kallast einingscella. Einingscella vert utspent av dei krystallografiske aksane $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$ som innbyrdes er relatert til einannan med ulike vinklar. α er vinkelen mellom $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$, β er vinkelen mellom $\langle a \rangle$ og $\langle c \rangle$ og γ er vinkelen mellom $\langle a \rangle$ og $\langle b \rangle$. Det eksisterar berre sju ulike typar einingsceller som geometrisk kan fylle eit tredimensjonalt rom og desse er definert ved ulike forhold og kombinasjonar av a , b , c , α , β og γ (Sybesma, 1989). Vanlegvis er det fleire molekyl i ei einingscelle og romgruppa til krystallen skildrar kva symmetri- og translasjonsrelasjonar det er mellom dei ulike molekyla i einingscella.

Krystallar av N-acetyl-L-tyrosin har monokline einingsceller der $|a| \neq |b| \neq |c|$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$ medan $\beta \neq 90^\circ$. Romgruppa til N-acetyl-L-tyrosin-krystallar er P21. P står for *primitiv* som er termen for det enklaste krystallsystemet som berre har punkt på hjørna i einingscella. 21 markerer at einingscella har ein totallig rotasjonsakse som i dette tilfellet vil vere $\langle b \rangle$ -aksen. For N-acetyl-L-tyrosin er $Z = 2$, det vil seie at einingscella inneheld to molekyl (Kozlak og van der Helm, 1981).

Dei to molekyla i einingscella vil generelt ha ulik orientering i forhold til eit ytre magnetfelt, sjå figur 3.2. Like radikal som stammar frå den same molekylstrukturen kan dermed gje ulik resonans både i EPR og ENDOR. Dette kallast *site-splitting* der "siten" til eit radikal avgjer kva resonans radikalet er opphav til. For ein monoklin krystall vil rotasjon om den totallige rotasjonsaksen $\langle b \rangle$ ikkje gje site-splitting. Rotasjon om dei andre aksane vil gje site-splitting for alle orienteringar i magnetfeltet, unnateke når magnetfeltet er parallelt med ein av dei krystallografiske aksane.

I einkrystalleksperimenta i denne oppgåva har vi valt å rotere krystallane om dei tre aksane $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c^* \rangle$. $\langle c^* \rangle$ står normalt på planet utspent av $\langle a \rangle$ og $\langle b \rangle$ og saman danner desse eit ortonormalt referansesystem. EPR-spekter vart teke opp for kvar 10. grad og ENDOR-spekter for kvar 5. grad. Posisjonane til resonanslinjene i ENDOR-spektra vart avleste og plotta som funksjon av rotasjonsvinkel. Dataprogrammet MAGRES bereknar hyperfinkoplingstensorane for dei ulike koplingane ved å utføre ei lineær tre-dimensjonal

tilpassing til dei eksperimentelt målte hyperfinsplittingane (Nelson og Gill, 1978; Nelson, 1980).

Forteikna til dei elementa i hyperfinkoplingstensen \hat{A} som ikkje er diagonalledd, vert bestemt av rotasjonsretninga i kvart plan. For einkrystallar med to molekyl i einingscella viser det seg å vere fire moglege kombinasjonar av forteikna på ikkje-diagonalledda til hyperfintensen. Etter ei diagonalisering av tensoren vil ein dermed sitje att med fire ulike sett prinsipalverdiar og tilhøyrande eigenvektorar. Dette er dei sokalla *Schonland-permutasjonane*. To av desse utgjer eit ”fysikalsk” sett med prinsipalverdiar og eigenverdiar som høyrer til kvart sitt molekyl i einingscella. Dei andre to utgjer eit sett med løysingar som ikkje er ”fysikalske” i den forstand at dei stammar frå feil kombinasjon av site og rotasjonsretning. Ein kan ofte skilje dei to løysingssetta ved at det ufysikalske settet har ei form på prinsipalverdiar som ikkje stemmer overeins med kjente koplingstypar, som til dømes dei i kapittel 2.2.2. Det fysikalske settet kan og bestemmast eksperimentelt ved å følge koplingane i eit plan der rotasjonsaksen for krystallen ikkje lenger er langs ein av dei krystallografiske aksane. I eit slikt skråplan vil berre fysikalske hyperfinmatriser kunne reprodusere eksperimentelle resonanslinjer.

Samanlikning av interatomiske retningsvektorar frå krystallografisk data og retningane til dei ulike eigenvektorane i det fysikalske løysingssettet avgjer vanlegvis kva matrise som høyrer til kva molekyl. Dei to tensorane i det fysikalske løysingssettet skil seg frå einannan ved ulike kombinasjonar på forteikna til eigenvektorane. For N-acetyl-L-tyrosin som dannar monokline krystallar med $\langle b \rangle$ som totalig rotasjonsakse, vil dei fysikalske tensorane vere relaterte til einannan ved forteiknskipte på eigenvektorane langs $\langle b \rangle$ -aksen.

3.2 Røntgendiffraksjon og krystallmontering

Som tidlegare nemnt inneber eit EPR/ENDOR-einkrystallforsøk at krystallen blir rotert om sine krystallografiske aksar i eit ytre magnetfelt og at spekter vert teke opp for ulike orienteringar i magnetfeltet. Ved å nytte eit Weissenberg røntgendiffraksjonskamera får ein kartlagt retningane til dei krystallografiske aksane i forhold til den ytre morfologien til krystallen.

Krystallen vert først montert på eit gonimeter som er konstruert slik at det er mogeleg å justere posisjonen til krystallen i alle retningar. Gonimeter med krystall vert så plassert med rotasjonsaksen parallell med aksa til ein sylinderforma filmhaldar. Ein motor sørgjer for at gonimeteret oscillerar om lag ti grader i kvar retning samstundes som krystallen vert bestrålt

av ein monokromatisk røntgenstråle normalt på rotasjonsaksen. Refleksjonane av røntgenstrålane i krystallgitteret blir fanga opp av filmen i sylindren og gjev eit sokalla diffraksjonsbilete. Dersom krystallaksen er orientert parallelt til rotasjonsaksen, vil refleksjonane danne parallelle rader på den framkalla filmen. Viss dette ikkje er tilfelle, er krystallen feilorientert og rotasjonsaksen til krystallen må justerast. Ut frå refleksjonane på filmen kan ein og finne lengda til krystallaksen. Avstanden mellom rader av same orden og senterlinja samanliknast med kalibreringskurver og gjev slik akselengda. Dersom denne lengda stemmer overeins med publiserte krystallografiske data, kan aksen endeleg bestemmast.

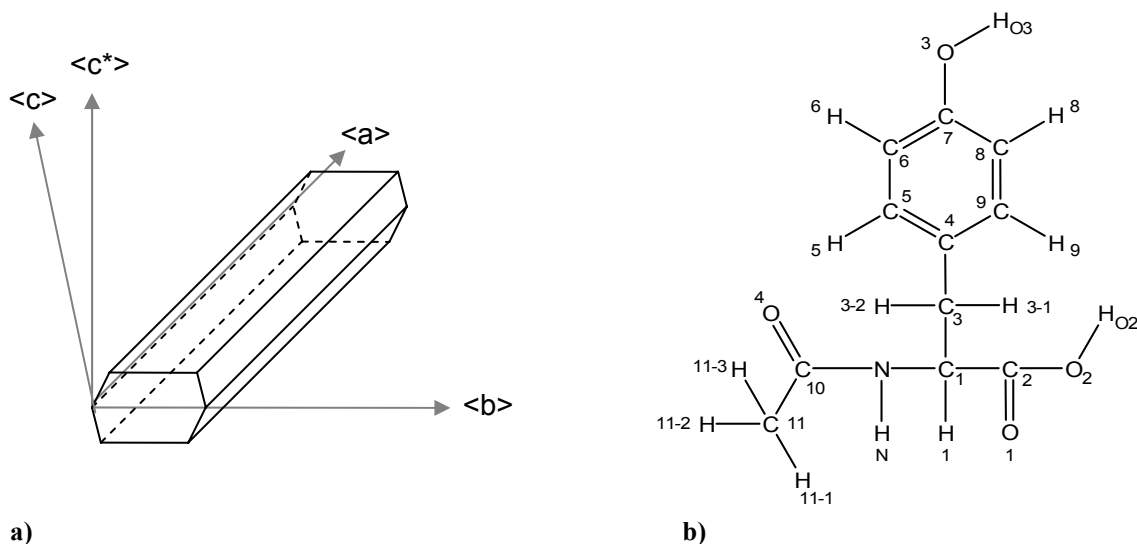
Før eit EPR/ENDOR-eksperiment må krystallen overførast til ein passende prøveholder. I denne oppgåva har krystallane vorte bestrålte ved to ulike temperaturar, romtemperatur ($T \sim 295$ K) og nedkjølte med flytande nitrogen ($T \sim 77$ K). Det er essensielt at dei radikala ein detekterer stammar frå krystallen og ikkje frå omliggande substansar som til dømes prøveholderen eller limemiddelet. For eit lågtemperaturforsøk må krystallen oppmonterast *før* bestråling og det vert difor nytta Bipax sølvepoxy-lim (Tra-Con Inc., 2006) til å feste krystallen til ein koparstav, sidan det i metall som sølv og kopar ikkje vert danna radikal ved ioniserande stråling. I eit romtemperaturforsøk unngår ein desse problema sidan krystallen monterast *etter* bestråling. Ei blanding av husholdingslim (Duco Cement) og amyl acetat vert nytta til å lime romtemperaturkrystallen til ein kvartsstav. Feilmarginen etter rotasjonskorreksjonar og overføring settast normalt til $1 - 2^\circ$, i begge tilfellene.

3.3 N-Acetyl-L-Tyrosin

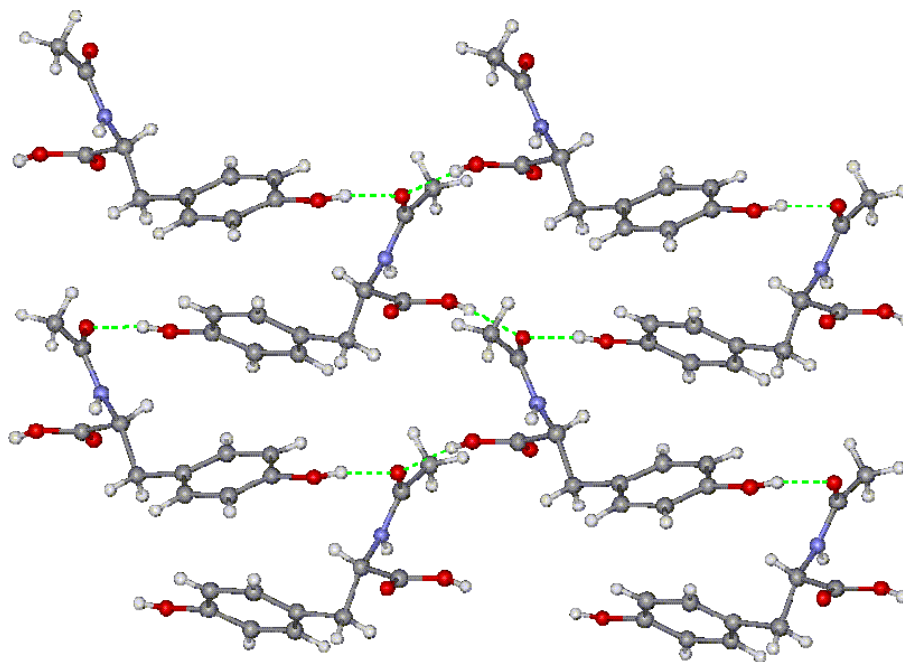
N-acetyl-L-tyrosine vart levert i pulverform frå *Sigma-Aldrich Chemie*. Pulveret viste seg å vere lett løseleg i både H_2O og D_2O . Ved romtemperatur trongst det ca. 13 ml H_2O for å løyse 1 g pulver medan det for same mengde pulver trongst om lag 20 ml D_2O . Løysingane vart fordelte i opne prøveglas som vart oppbevarte i romtemperatur. Etter 1-2 veker med fordamping danna det seg krystallar av ulik storleik i løysingane. Dei største krystallane hadde dimensjonar opp mot $20 \times 5 \times 4$ mm medan størsteparten var små og nåleforma. I figur 3.1 a) er den ytre morfologien til ein krystall av N-acetyl-L-tyrosine vist. Morfologien varierte noko frå krystall til krystall, men dette mønsteret let seg identifisere i dei fleste krystallane.

N-acetyl-L-tyrosine krystalliserar som tidlegare nemnt i den monokline romgruppa P21. Celleparametrane er $a = 5,994$ Å, $b = 7,495$ Å og $c = 12,510$ Å med $\beta = 101,77^\circ$ og $Z = 2$ (Kozslak og van der Helm, 1980). Aksane $\langle a \rangle$ og $\langle b \rangle$ vart identifiserte med røntgendiffraksjon. Strukturformelen for N-acetyl-L-tyrosin er vist i figur 3.1 b) og

krystallografiske data for krystallen er gjevne i appendiks A. I figur 3.2 er åtte molekyl av N-acetyl-L-tyrosin viste og til saman utgjer desse 4 einingsceller. Dei grøne stipla linjene i figuren markerer hydrogenbindingar som er med på å stabilisere strukturen.



Figur 3.1: a) Skisse av den ytre morfologien til ein krystall av N-acetyl-L-tyrosin, b) Molekylstrukturen til N-acetyl-L-tyrosin.



Figur 3.2: Åtte N-acetyl-L-tyrosin-molekyl som til saman utgjer fire einingsceller sett inn frå ei tilfeldig orientering. Konfigurasjonen vert stabilisert av hydrogenbindingar, viste som grøne stipla linjer.

3.4 Røntgenbestråling

Røntgenrøret nytta i denne oppgåva er eit Philips PW 1732/10-rør med anode av krom som har maksimal spenning på 100 kV. Kraftforsyninga er eit Philips PW 1732/10 3 kW powersupply.

For romtemperaturbestrålingane vart krystallane plasserte i eit røntgentett bur med ein avstand på ca 6 cm frå røntgenrøret og gjeve 60 kV, 40mA stråling. Dette svarar til ein doserate på om lag 35 kGy/h. Krystallane vart bestrålte i 1,5- 3 timar som gjev totaldosar mellom 53-105 kGy. Lågtemperaturbestrålingane fann stad etter at krystallane var monterte på metallstavar, plasserte i kaviteten og nedkjølte ved hjelp av flytande nitrogen. Same røntgenrørinnstillingar som over vart nytta, men doserata vart noko lågare ved denne oppstillinga og er estimert til 9,4 kGy/h. Krystallane vart bestrålte i 3-5 timar som tilsvarar totaldoser mellom 28- 47 kGy. Som følgje av bestråling gjekk krystallane frå å vere blanke til å få ein gulbrun matt farge.

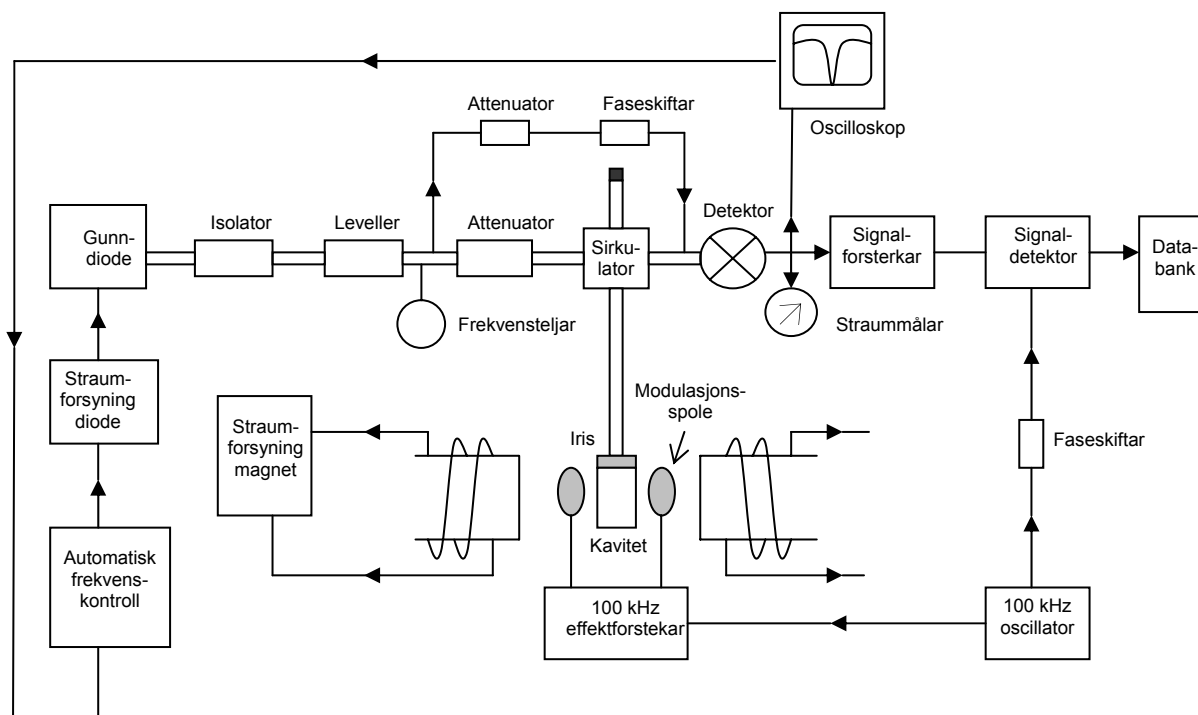
3.5 EPR-spektrometeret

Det grunnleggjande prinsippet i eit EPR-eksperiment er å indusere elektronspinnovergangar i ei prøve og å detektere ved kva magnetfelt desse overgangane finn stad, jamfør kapittel 2.3.1. Figur 3.3 viser eit noko forenkla blokkdiagram av eit EPR-spektrometer. Spektrometeret kan prinsipielt delast inn i fire hovuddelar; ein elektromagnet, ei mikrobølgjekjelde, ein kavitet som inneheld ei prøve og eit detektorsystem.

Elektromagneten set opp eit homogent magnetfelt over kaviteten. Eksperimenta i dette arbeidet er føretekte i X-band. Det vil seie at resonansfrekvensen til mikrobølgjene ligg rundt 9,5 GHz, noko som svarar til ein magnetfeltverdi på om lag 0,34 Tesla.

Mikrobølgjegeneratoren, i vårt tilfelle ei *Gunn-diode* med maksimal effekt på rundt 400 mW, genererar mikrobølgjer innanfor eit smalt frekvensområde. Desse transporterast til kaviteten via metalliske bølgeleiarar. *Bølgeleiarane* er spesialkonstruerte for å leie mikrobølgjer med visse frekvensar og polarisasjonsretningar med minst mogleg tap av effekt undervegs til kaviteten. *Isolatoren* sørger for at mikrobølgjer som reflekterast frå resten av systemet ikkje når attende til mikrobølgjegeneratoren og forstyrrar denne. På grunn av at mikrobølgjekjeldene ofte tapar effektivitet med tid nyttast ein *leveller* som kuttar mikrobølgjeeffekt over eit visst nivå (typisk 215 mW). Ein variabel *attenuator* dempar effekten til mikrobølgjene til ønska nivå. *Kaviteten* er dimensjonert for å danne eit ståande mikrobølgjemønster med minimal elektrisk komponent ($E_1=0$) og maksimal

magnetfeltkomponent (B_1) i senteret av kaviteten. B_1 er retta normalt på hovudmagnetfeltet frå elektromagneten og dannar slik det perturberande feltet skildra i kapittel 2.1.2. For best mogleg signalfølsemd, må kaviteten vere kritisk kopla til bølgleiaren og ikkje reflektere mikrobølgjer attende til bølgleiaren. Det vil seie at impedansen til kaviteten må vere lik impedansen til bølgleiaren og dette sørgjer den regulerbare *irisen* for. Magnetfeltet B_1 vert sveipa og når resonansføresetnaden er oppfylt vil prøva absorbere mikrobølgeenergi. Det vil då ikkje lenger vere kritisk kopling mellom kaviteten og bølgleiaren. Mikrobølgjer vil verte reflekterte attende til bølgleiaren og vil passere *sirkulatoren* før dei når *detektoren*. Sirkulatoren sørgjer for at detektoren berre registrerar dei mikrobølgjene som er reflekterte frå kaviteten og ikkje mikrobølgjer som stammar frå andre delar av spektrometeret. Detektoren er ei diode som registrerar spenningsvariasjonar og som omdannar desse til elektrisk straum. Følsemda og signalstyrka til detektoren er optimal når straumen ligg i det lineære området til dioda og dette sørgjer *referansearmen* for. Ein del av mikrobølgeeffekten frå gunndioda vert tappa av og leia inn i referansearmen og ut til detektoren som ein ”bias”. Ein attenuator regulerar effektnivået og ein faseskiftar sørgjer for at referansemikrobølgjene er i fase med dei reflekterte mikrobølgjene frå kaviteten. Ved å sende vekselstraum gjennom to *modulasjonsspolar* kan hovudmagnetfeltet modulerast og med ein fasesensitiv detektor kan ein registrere endring i absorpsjon som funksjon av endring i magnetfelt. I praksis vil dette seie at ein tek opp den 1. deriverte av det opphavelge EPR-absorpsjonssignalet. Denne framgangsmåten gjer det enklare å forsterke EPR-signalet og å filtrere bort støy.



Figur 3.3: Forenkla blokkdiagram av eit EPR-spektrometer.

For eit ENDOR-eksperiment kjem det radiofrekvente feltet i tillegg til den vanlege EPR-apparaturen. I ein ENDOR-kavitet vil ein spole omslutte prøva. Ved å leie rf-bølgjer via ein forsterkar og inn i spolen, får ein danna eit tidsavhengig magnetfelt B_2 som står vinkelrett på hovudmagnetfeltet og det perturberande feltet B_1 . Ved å sveipe rf-feltet vil ein få induisert kjernespinnovergangar når resonansføresetnaden for kjernar er oppfylt.

3.6 EPR/ENDOR/EIE- apparatur og parametrar

I det føreliggande arbeidet er det nytta eit *BRUKER EleXsyS 560 SuperX* X-band EPR/ENDOR-spektrometer. For ENDOR-målingane vart det i tillegg nytta *DICE ENDOR*-teknologi frå Bruker. Denne apparaturen gav eit firkantmodulert rf-felt som vart forsterka anten i ein *ENI 3200L* 200 W eller i ein *AR A220* 150 kW forsterkar. Databehandlinga skjedde via eit Linux-system med *BRUKER X-EPR* programvare.

I romtemperaturreksperimenta vart krystallane etter bestråling, plasserte i ein sylindrisk TM_{011} EPR/ENDOR- kavitet frå Bruker. Det viste seg at å kjøle systemet med kald nitrogengass til temperaturar på rundt 240 K reduserte støykomponentane i ENDOR-spektra synleg.

For lågtemperaturforsøka vart koparstavar med krystallar montert til ein *Air Products LT3-110* kryostat og ført ned i ein sylindrisk TM_{011} EPR/ENDOR-kavitet. Med ei slik oppstilling kan krystallen haldast nedkjølt under heile eksperimentet, inkludert under bestråling. Ein temperaturmålar kopla til systemet gjev full kontroll over temperaturen i kaviteten, samstundes som eit varmeelement gjer det mogleg å varme opp systemet til ønska temperatur. Tabellane 3.1 og 3.2 listar dei mest relevante instrumentelle parametranne nytta i dette arbeidet.

3 Material og metodar

Tabell 3.1: Parametrar nytta i romtemperaturforsøka. Krystallane vart bestrålte ved 295 K men under målingane vart krystallane kjølte med kald nitrogengass til om lag 240 K.

EPR (240 K)	Attenuering (mikrobølger)	20 dB
	Modulasjonsbreidde (magnetfelt)	0.1 mT
	Modulasjonsfrekvens (magnetfelt)	10 kHz
	Sweeptid	83.89 s
	Tidskonstant	163.84/327.68 ms
	Sweepbreidde	17.5 mT
ENDOR (240 K)	Attenuering (mikrobølger)	6/8 dB
	Attenuering (rf-felt)	1/2 dB
	Modulasjonsdjubde (rf-felt)	160/200 kHz
	Modulasjonsfrekvens (rf-felt)	10 kHz
	Sweeptid	335.54 s
	Tidskonstant	655.36 ms
	Sweepbreidde	1-36/35-71 MHz
EIE (240 K)	Attenuering (mikrobølger)	6/8 dB
	Attenuering (rf-felt)	2 dB
	Modulasjonsdjubde (rf-felt)	160/200 kHz
	Modulasjonsfrekvens (rf-felt)	10 kHz
	Sweeptid	335.54 s
	Tidskonstant	1310.72 ms
	Sweepbreidde	17.5 mT

Tabell 3.2: Parametrar nytta i lågtemperaturforsøka. Krystallane vart bestrålte og målte ved 77 K.

EPR (77 K)	Attenuering (mikrobølger)	36dB
	Modulasjonsbreidde (magnetfelt)	0.25 mT
	Modulasjonsfrekvens (magnetfelt)	100 kHz
	Sweeptid	83.89 s
	Tidskonstant	327.68 ms
	Sweepbreidde	17.5 mT
ENDOR (77 K)	Attenuering (mikrobølger)	9 dB
	Attenuering (rf-felt)	1/2 dB
	Modulasjonsdjubde (rf-felt)	180 kHz
	Modulasjonsfrekvens (rf-felt)	10 kHz
	Sweeptid	335.54 s
	Tidskonstant	655.36 ms
	Sweepbreidde	3-32/31-60 MHz
EIE (77 K)	Attenuering (mikrobølger)	9 dB
	Attenuering (rf-felt)	2 dB
	Modulasjonsdjubde (rf-felt)	180 kHz
	Modulasjonsfrekvens (rf-felt)	10 kHz
	Sweeptid	335.54 s
	Tidskonstant	1310.72 ms
	Sweepbreidde	17.5 mT

3.7 Density Functional Theory (DFT)

Schrödingerlikninga for eit molekylært mangepartikkelsystem let seg som kjent ikkje løyse analytisk og det må i staden gjerast forenklingar og approksimasjonar. Tradisjonelle approksimasjonsmetodar som til dømes Hartree-Fock, baserer seg på å bestemme den totale elektronbølgjefunksjonen Ψ , noko som for fleirpartikkelsystem ikkje berre er ekstremt komplisert, men i tillegg svært tidkrevjande sett frå ein databehandlingsståstad. *Density functional theory* (DFT) baserer seg på elektrontettleiksfunksjonen ρ i staden for den totale elektronbølgjefunksjonen Ψ . Tettleiken ρ representerar ein ”enklare” kvantitet enn Ψ , blant anna sidan ρ berre varierar med posisjonen \vec{r} , medan Ψ avheng av $3N$ variablar for N elektron i systemet.

Trass i at DFT har sine røter i Thomas-Fermi modellen (Wikipedia, 2006), stod ikkje DFT på fast fundament før Hohenberg og Kohn (HK) etablerte sine teorem i 1964. Det første HK-teoremet, *eksistensteoremet*, hevdar at det eksisterar eit eintydig forhold mellom grunntilstanden til elektrontettleiken ρ_0 og grunntilstanden til elektronbølgjefunksjonen for eit mangepartikkelsystem Ψ_0 . Dersom ρ_0 er kjent vil dermed grunntilstanden Ψ_0 kunne bestemmast. Grunntilstanden bestemmer igjen alle eksiterte tilstandar i systemet. ρ_0 inneheld slik all informasjon naudsynt for å løyse Schrödingerlikninga. Men sjølv om eksistensteoremet fastslår at det fins eit eintydig forhold mellom ρ_0 og Ψ_0 , seier ikkje teoremet noko om kva forholdet faktisk er. Det andre HK-teoremet, *variasjonsteoremet*, viser at grunntilstanden til elektrontettleiken representerar eit minimum til den totale elektronenergien til mangepartikkelsystemet (Hohenberg og Kohn, 1964).

I nær alle DFT-algoritmar inngår eit matematisk rammeverk etablert av Kohn og Sham (KS). Innanfor dette rammeverket vert systemet av N vekselverkande elektron i eit statisk eksternt potensial redusert til eit system av N ikkje-vekselverkande elektron i eit effektivt potensial. Som ein konsekvens av eksistensteoremet kan energifunksjonalen* for eit ikkje-relativistisk tidsuavhengig mangepartikkelsystem skrivast (Cramer, 2004):

$$E[\rho(\vec{r})] = T_{iv}[\rho(\vec{r})] + V_{ke}[\rho(\vec{r})] + V_{ee}[\rho(\vec{r})] + \Delta T[\rho(\vec{r})] + \Delta V_{ee}[\rho(\vec{r})] \quad (3.1)$$

T_{iv} er den kinetiske energien til alle ikkje-vekselverkande elektron og V_{ke} er den potensielle Coulombenergien mellom kjernar og elektron. Det tredje leddet, V_{ee} , er den energien elektrona ville hatt i sitt eige felt dersom elektronrørslene var heilt uavhengige av einannan og

* Ein funksjonal er ein funksjon av ein funksjon.

viss kvart elektron opplevde ei fråstøyting frå seg sjølv. Men elektrona er verken uavhengige eller sjølvfråstøytande og dei to siste ledda i likning 3.1 korrigerar for dette. ΔT -termen inneheld ein korreksjon til den kinetiske energien T_{iv} , sidan det generelt vil vere ein innbyrdes vekselverknad mellom elektronspinn. ΔV_{ee} er ein *exchange*-korreksjon til den klassiske potensielle energien V_{ee} . Det effektive potensialet i KS-metoden inkluderer altså både eit eksternt potensialfelt og effektane av Coulombvekselverknadar elektron i mellom. Utfordringa i DFT ligg i at dei eksakte uttrykkja for *exchange*- og korrelasjonsledda ΔV_{ee} og ΔT berre er kjende for ein uniform elektrongass. For eit molekylært mangeartikkelsystem må ein difor konstruere funksjonalar som skildrar desse vekselverknadane mest mogleg nøyaktig. I dette arbeidet er det i alle DFT-berekingane nytta ein hybridfunksjonal* kalla B3LYP. B3 står for ein *exchange*-funksjonal med tre parametarar (Becke, 1993) og LYP er ein mykje brukt korrelasjonsfunksjonal som har fått namn etter sine opphavsmenn Lee, Yang og Parr (Lee *et al.*, 1988).

KS-metoden resulterer i ei integraldifferensiallikning som i utgangspunktet kan løysast rett fram numerisk, men det viser seg å vere svært tidssparande å innføre eit basissett som matematisk representerer molekylorbitala. Eit basissett dannast ved lineærkombinasjonar av atomorbital (LCAO-ekspansasjon) og kan tolkast som ei romleg avgrensing av kvart enkelt elektron. Det fins mange ulike basissett, bygd opp av ulike basisfunksjonar. Dei to vanlegaste basisfunksjonane er *Slater-type* orbital (STO) og *Gauss-type* orbital (GTO). STO har betre samsvar med atomorbitala til ulike kjernar enn GTO, men dei er samstundes meir kompliserte og meir tidkrevjande å rekne med. Løysinga er å setje saman fleire GTO i lineærkombinasjonar og slik danne tilfredstillande approksimasjonar til bølgefunksjonen. Denne framgangsmåten kallast *Contracted-Gaussian-Function* (CGF). Generelt kan ein dele basissett inn i to kategoriar, minimale basissett og utvida basissett. Eit minimalt basissett er samansett av det minste tal atomorbital som kan skildre dei mest basale eigenskapane til atomet og ein går ut frå at alle orbitala er s-orbital. Eit utvida basissett tek omsyn til høgare orbital i molekylet (p, d, f...) i tillegg til storleik og form på ladningsfordelinga over molekylet. Det fins mange typar utvida basissett, men i dette arbeidet er det utelukkande nytta splittvalenssett. Dette er basissett som skildrar kvart elektron i valensorbital med to til tre CGF med same form, men med ulik storleik. Dette gjev fleksibilitet ved at atomorbitala kan endre storleik alt etter kva molekylære forhold dei opplever. Elektrona i indre skal vil ha lita innverknad på systemet, så i eitt splittvalenssett vert kvart av desse elektrona estimert med ein enkel CGF. Dette lettar dei numeriske utrekningane.

* Hybridfunksjonalar definerer exchangefunksjonalar som lineærkombinasjonar av Hartree-Fock, lokal- og gradientkorrigererte exchangetermar. Exchangefunksjonalen vert deretter kombinert med ein lokal/gradientkorrigert korrelasjonsfunksjonal.

Eit døme på eit CGF-splittbasissett er 6-311+G(D). Det vil seie at 6 GTO-funksjonar kombinerast for å skildre elektron i indre skal, 3 GTO kombinerast for å skildre det første p-orbitalet og 1 GTO skildrar kvar av dei to andre p-orbitala. Når atomorbital kjem tilstrekkeleg nær einannan vil dei innbyrdes verte påverka av ladningsfordelingane til einannan og dei kan endre form frå å vere reine s-, p-, d-orbital (etc.) til å få ei blandingsform. Dette kallast polarisasjon og må takast omsyn til når ein skal danne basissett. D i splittbasissettet over, indikerar at ein polariserar d-atomorbitala ved å legge til atomorbital med høgare angulært moment (f, g, ...). + markerer at det vert addert eit sett med diffuse s- og p-atomorbital til alle atoma utanom hydrogenatoma. Diffuse atomorbital er vanlege atomorbital med veldig stor utstrekning og er spesielt nyttige for ladde eller eksiterte molekyl (Shodor, 2000).

DFT er ein del av programpakken Gaussian03 (Frisch *et al.*, 2004) og har i denne oppgåva vorte nytta til å berekne optimale radikalstrukturar og hyperfinkoplingstensorar. Programmet startar med å finne den energimessig optimale strukturen til eit føreslått radikal. Til dette arbeidet vert ein rimeleg enkel 6-311+G(D)-basis nytta. Gaussian03 tek så utgangspunkt i den optimaliserte radikalstrukturen og reknar ut alle isotrope og anisotrope hyperfinkoplingskonstantar i radikalet. Til dette vert det nytta ein meir eksakt splittbasisfunksjon, 6-311+G(2df,p), som har vist seg å gje gode estimat av mange typar eksperimentelle resultat (Gauld *et al.*, 1997). I tillegg til 6-311 basisen skildra i avsnittet over, vil to sett d-orbital og eitt sett f-orbital polarisere ikkje-hydrogenatoma og eitt sett p-orbital vil polarisere hydrogenatoma. Alle atoma, utanom hydrogenatoma, får addert diffuse s- og p-orbital. Dei berekna hyperfinkoplingstensorane kan så samanliknast med dei eksperimentelle hyperfinkoplingstensorane frå MAGRES (Nelson og Gill, 1978; Nelson, 1980). DFT tek i utgangspunktet ikkje omsyn til vekselverknadar mellom molekyl sidan berekningane berre vert gjort for isolerte molekyl. Det vil difor alltid vere venta eit visst avvik mellom slike DFT berekningar og eksperimentelle data.

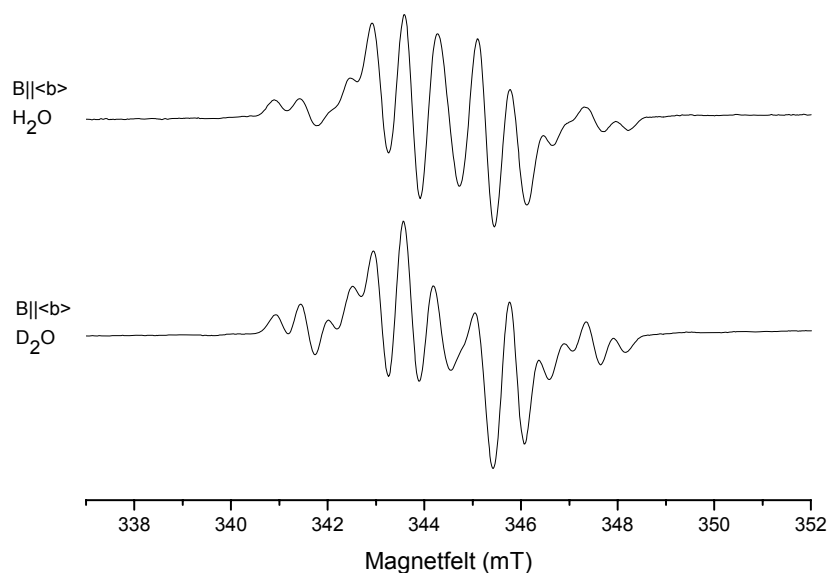
I tillegg til MAGRES (Nelson og Gill, 1978; Nelson, 1980) og Gaussian03 (Frisch *et al.*, 2004), har det i arbeidet med denne oppgåva vorte nytta diverse simuleringsprogram, plottprogram, molekylprogram etc. I appendiks B er det gjeve ei liste over dei mest relevante dataprogramma som er nytta i dette arbeidet.

4 Resultat og analyse av romtemperaturdata

I romtemperaturreksperimenta vart einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved om lag 295 K, monterte på kvartsstavar for deretter å verte undersøkte med EPR/ENDOR/EIE-spektroskopi. Det viste seg at å kjøle systemet med nitrogengass til om lag 240 K under målingane, betra signal-støyforholdet noko.

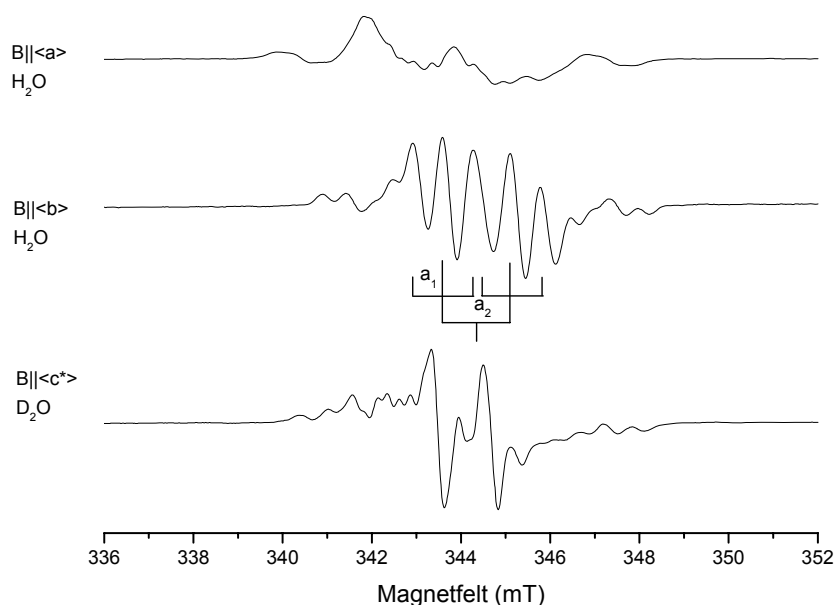
4.1 EPR-resultat (295 K)

EPR-spektra vart teke opp medan krystallane vart roterte om dei tre ortogonale referanseaksane $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c^* \rangle$, i ti graders intervall. Det vart gjort forsøk både med krystallar grodd i D_2O og krystallar grodd i H_2O . I figur 4.1 er det øvste EPR-spekteret frå ein H_2O -krystall og det nedste EPR-spekteret frå ein D_2O -krystall, bestrålte ved romtemperatur. Begge EPR-spektra er tekne opp med magnetfeltet retta langs den krystallografiske $\langle b \rangle$ -aksen.



Figur 4.1: 1. deriverte EPR-spekter for einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 295 K og målte ved 240 K. Det øvste spekteret er frå ein krystall dyrka i H_2O og det nedste frå ein krystall dyrka i D_2O . Begge spektra er tekne opp med magnetfeltet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen. Magnetfeltskalaen tilsvarer ein mikrobølgjefrekvens på 9,6420 GHz.

Figur 4.1 viser like mange oppløyste resonanslinjer for deutererte krystallar som for ikkje-deutererte krystallar, men dei sentrale resonanslinjene varierar noko i intensitet. Det ser og ut til at resonanslinjene for deutererte krystallar er noko betre oppløyste enn resonanslinjene for ikkje-deutererte krystallar. Dette skuldast truleg små uoppløyste koplingar som i spektra frå ikkje-deutererte krystallar berre gjev bidrag til linjebreiddene, men som let seg byte ut med deuterium og difor ikkje gjev bidrag i spektra frå deutererte krystallar. ENDOR-eksperimenta gav ingen synlege forskjellar i spektra frå deutererte og ikkje-deutererte krystallar. Resonanslinjene som er observerte i EPR- og ENDOR-spektra skuldast difor truleg vekselverknadar med proton som ikkje let seg byte ut med deuterium. På grunn av dette har resultat frå deutererte krystallar vorte nytta side om side med resultat frå ikkje-deutererte krystallar.



Figur 4.2: 1. deriverte EPR-spekter frå krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur (295 K) og målte ved 240 K. Det øvre spekteret er teke opp med magnetfeltet parallelt med $\langle a \rangle$ -aksen (H_2O -krystall), det midtre spekteret med magnetfeltet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen (H_2O -krystall) og det nedre spekteret med magnetfeltet parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen (D_2O -krystall). Magnetfeltskalaen tilsvarer ein mikrobølgefrequens på 9,6420 GHz. Splittingane er målt til å vere $a_1=0,68$ mT og $a_2=1,51$ mT.

Figur 4.2 viser førstederiverte EPR-spekter tekne opp med magnetfeltet retta langs dei krystallografiske referanseaksane $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c^* \rangle$. Det nedste spekteret er frå ein deuterert krystall medan dei to øvre spektra er frå ikkje-deutererte krystallar. EPR-spektra inneheld overlappande linjebidrag frå alle radikala i prøva. I tillegg til denne overlappinga, vil site-splitting i to av tre rotasjonsplan vere med på å gjere EPR-spektra komplekse. Å identifisere dei ulike radikala berre på bakgrunn av EPR-spektra er difor vanskeleg. Nokre slutningar kan

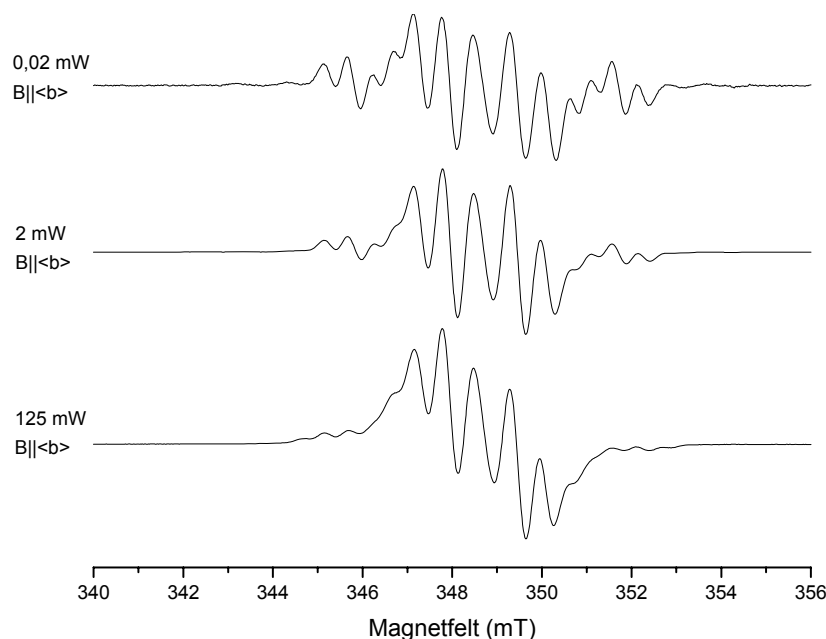
ein likevel trekke ut frå figur 4.2. $\langle b \rangle$ -aksespekteret har fem resonanslinjer i senteret av spekteret og avstanden mellom dei ytste toppane er om lag 2,8 mT. Dei fem resonanslinjene stammar truleg frå eit og same radikal, som vidare i denne oppgåva vert kalla radikal I. Intensiteten til resonanslinjene har tilnærma ei 1:2:2:2:1-fordeling. Ei kopling med koplingskonstant a_2 og to ekvivalente koplingar med koplingskonstant a_1 vil gje opphav til ei slik intensitetsfordeling dersom $2a_1$ er i same storleiksorden som a_2 . Frå $\langle b \rangle$ -aksespekteret i figur 4.2 er a_1 målt til 0,68 mT, som tilsvare 19,2 MHz. Splittingskonstanten a_2 er målt til 1,51 mT, som tilsvare 42,1 MHz. $\langle b \rangle$ -aksespekteret har og nokre mindre intense resonanslinjer på flankane i spekteret og desse har ei total breidde på om lag 7,0 mT. Flankeresonansane må stamme frå eit anna radikal (radikal II).

I $\langle c^* \rangle$ -aksespekteret nedst i figur 4.2 skil det seg og ut to grupper resonanslinjer. Resonanslinjene på flankane i spekteret vert som for $\langle b \rangle$ -aksespekteret, tilordna radikal II. Dubletten i senteret av $\langle c^* \rangle$ -aksespekteret må derimot stamme frå eit tredje radikal, radikal III. Hyperfinsplittinga mellom dei to toppane i dubletten er på om lag 1,2 mT ved denne orienteringa.

Frå EPR-spekteret med magnetfeltet retta langs $\langle a \rangle$ -aksen er det ikkje mykje informasjon å hente sidan resonanslinjene til dei ulike radikala ser ut til å ”flyte saman” ved denne orienteringa. Men i likskap med $\langle c^* \rangle$ -aksespekteret er $\langle a \rangle$ -aksespekteret asymmetrisk, og denne asymmetrien indikerar nærvær av ulike radikal med ulike g-verdiar.

Det vart undersøkt om EPR-signalet vart påverka av variasjonar i mikrobølgjeeffekt. Figur 4.3 viser tre EPR-spekter, alle med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen for ein ikkje-deutert krystall bestrålt og målt ved 295 K. Spektra er, frå nedst til øvst, tekne opp med mikrobølgjeeffektar på høvesvis 125 mW, 2 mW og 0,02 mW. Det synast av figuren som om flankeresonansane (radikal II) vert metta ved lågare mikrobølgjeeffekt enn resonansane i senteret av spekteret (radikal I) noko som stadfestar at resonansane i $\langle b \rangle$ -aksespekteret stammar frå minst to ulike radikal.

ENDOR-spektroskopi har, som skildra i kapittel 2.3.2, ei rekkje fordelar framfor EPR-spektroskopi. Blant anna er det i ENDOR-spektra mogleg å skilje radikal som gjev overlappende resonansar i EPR-spekteret. Den vidare analysen av radikala som dannast i N-acetyl-L-tyrosin etter bestråling ved romtemperatur er difor gjort ved hjelp av ENDOR-spektroskopi.

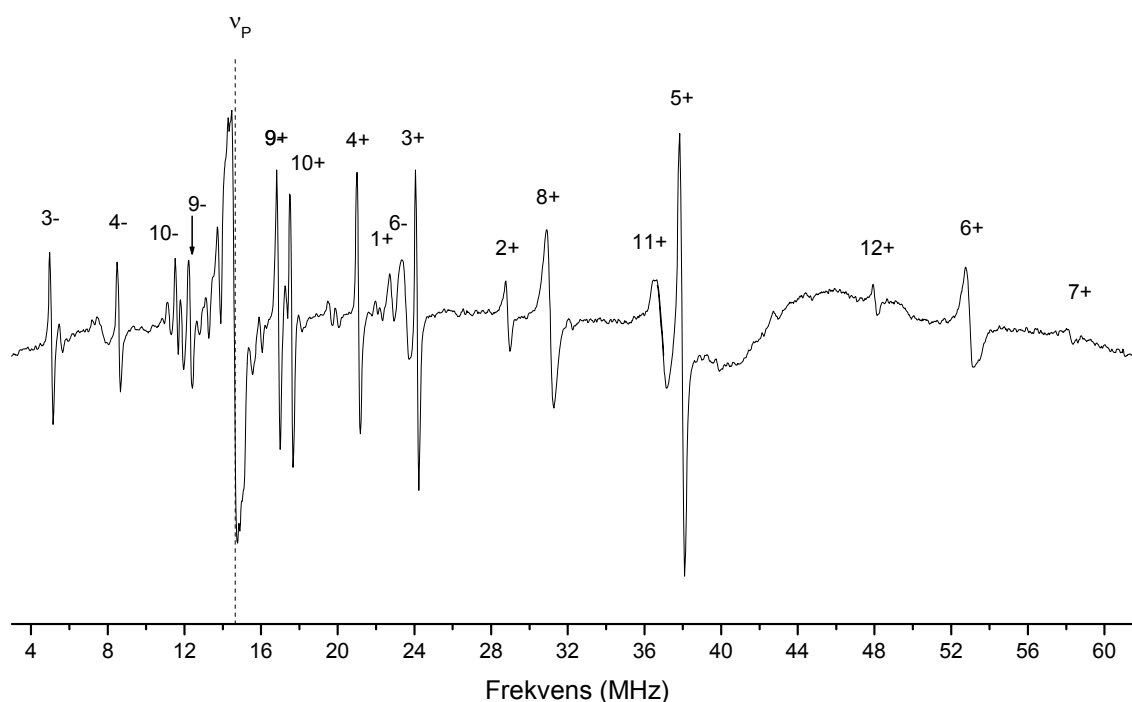


Figur 4.3: EPR-spekter for ein ikkje-deutert N-acetyl-L-tyrosin-krystall bestrålt og målt ved romtemperatur (295 K). Retninga til magnetfeltet var langs den krystallografiske $\langle b \rangle$ -aksen og spektra vart tekne opp ved ulike mikrobølgeeffektar (0,02, 2 og 125 mW). Intensiteten til dei ulike spektra har vorte justert og kan difor ikkje samanliknast innbyrdes. Magnetfeltskalaen tilsvarer ein mikrobølgefrekvens på 9,7713 GHz.

4.2 ENDOR og EIE av N-acetyl-L-tyrosin (295 K)

I ENDOR låser ein magnetfeltet til ei EPR-linje og sveiper rf-feltet slik at ein får induisert kjernespinnoverganger. ENDOR-resonanslinjene er spesifikke for den EPR-overgangen ein har låst magnetfeltet til. I dei fleste ENDOR-forsøka vart magnetfeltet låst til ei av dei sentrale resonanslinjene i EPR-spektra og ENDOR-spektra vart teke opp for kvar femte grad i tre ortogonale rotasjonsplan.

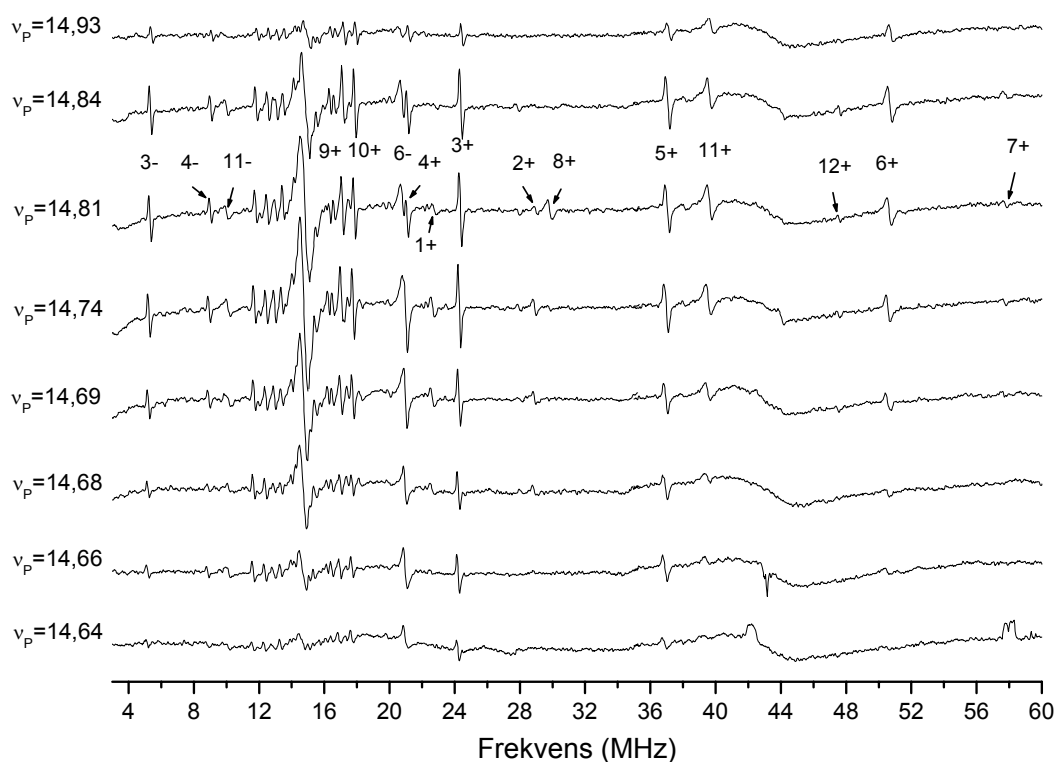
Figur 4.4 viser eit 1.derivert ENDOR-spekter frå ein deutert N-acetyl-L-tyrosin-krystall bestrålt ved romtemperatur og målt ved 240 K. Magnetfeltet er retta parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen og magnetfeltverdien er låst i senteret av EPR-spekteret. ENDOR-resonanslinjene er nummererte 1-12, men berre resonanslinje 1-8 let seg følgje i tre ortogonale rotasjonsplan. Resonansfrekvensen for frie protonkjernar er vist som ν_p og +/- markerer om ei resonanslinje er ei høgfrekvent eller ei lågfrekvent grein av ei kopling. For kopling 1, 2, 5, 7, 8, 11 og 12 i figur 4.4, kan berre den eine greina av koplinga identifiserast. Kopling 6- var synleg når krystallen vart rotert om $\langle a \rangle$ -aksen, men ikkje i dei andre rotasjonsplana.



Figur 4.4: 1. derivert ENDOR-spekter av ein deutert N-acetyl-L-tyrosin-krystall bestrålt ved romtemperatur (295 K) og målt ved om lag 240 K. Magnetfeltverdien er låst til ei av dei sentrale EPR-linjene og magnetfeltet er retta parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen. Resonanslinjene er nummererte 1-12 og +/- markerer om det er ei hørfrekvent eller ei lårfrekvent grein av ei kopling. $v_P \approx 14,6$ MHz er resonansfrekvensen til eit fritt proton.

Når berre den eine greina av ei kopling er synleg i ENDOR-spekteret, kan det i utgangspunktet vere vanskeleg å avgjere om det er den lårfrekvente eller den hørfrekvente greina av koplinga ein har med å gjere. Dette vil igjen skape problem ved etablering av hyperfinmatrisene. Ein metode som nyttast for å løyse dette problemet er å ta opp spekter med magnetfeltverdien låst til ulike resonanslinjer i EPR-spekteret. Etter resonansføresetnaden i kapittel 2.1.2 vil resonansfrekvensen for frie proton, v_P , vere proporsjonal med magnetfeltverdien B . Og sidan v_P inngår i uttrykkja for ENDOR-resonansfrekvensar (sjå kapittel 2.3.2), vil posisjonen til ENDOR-linjene endre seg når magnetfeltverdien vert endra. Av likningane i kapittel 2.3.2 ser ein at for små koplingar ($|a|/2 < hv_P$) vil både hørfrekvente og lårfrekvente resonanslinjer flytte seg mot høgare frekvensar når magnetfeltet aukar i verdi. For store koplingar ($|a|/2 > hv_P$) vil den hørfrekvente resonanslinja flytte seg mot høgare frekvensar medan den lårfrekvente resonanslinja vil flytte seg mot lågare frekvensar når magnetfeltverdien aukar.

Figur 4.5 viser 1. deriverte ENDOR-spekter frå ein ikkje-deutret N-acetyl-L-tyrosin-krystall tekne opp med magnetfeltet låst til ulike resonanslinjer i EPR-spekteret. I dette eksperimentet var krystallen montert på ein koparstav og den vart både bestrålt og målt ved romtemperatur. Magnetfeltretninga var parallell med den krystallografiske $\langle c^* \rangle$ -aksen. Frå figuren kan ein merke seg korleis ENDOR-linjene endrar posisjon når friprotonfrekvensen vert endra. Ved hjelp av slike analyser har lågfrekvente og høgfrekvente koplingsgreiner vorte identifiserte og merka med $-/+$. I fleire av spektra i figur 4.5 overlappar resonanslinjene til koplingane $4+$ og $6-$, men når friprotonfrekvensen aukar ser ein at linjene vert separerte. Dette kjem av at linje $6-$, som er ei lågfrekvent grein av ei stor kopling, vil flytte seg mot lågare frekvensar, medan linje $4+$, som er ei høgfrekvent grein av ei mindre kopling, vil flytte seg mot høgare frekvensar når ν_P aukar.



Figur 4.5: 1. deriverte ENDOR-spekter av ein ikkje-deutret N-acetyl-L-tyrosin-krystall med magnetfeltretninga parallell med $\langle c^* \rangle$ -aksen. Krystallen var montert på ein stav av kopar og vart bestrålt og målt ved romtemperatur. Magnetfeltstyrken er låst både til dei sentrale resonansane og til flankeresonansane i EPR-spekteret.

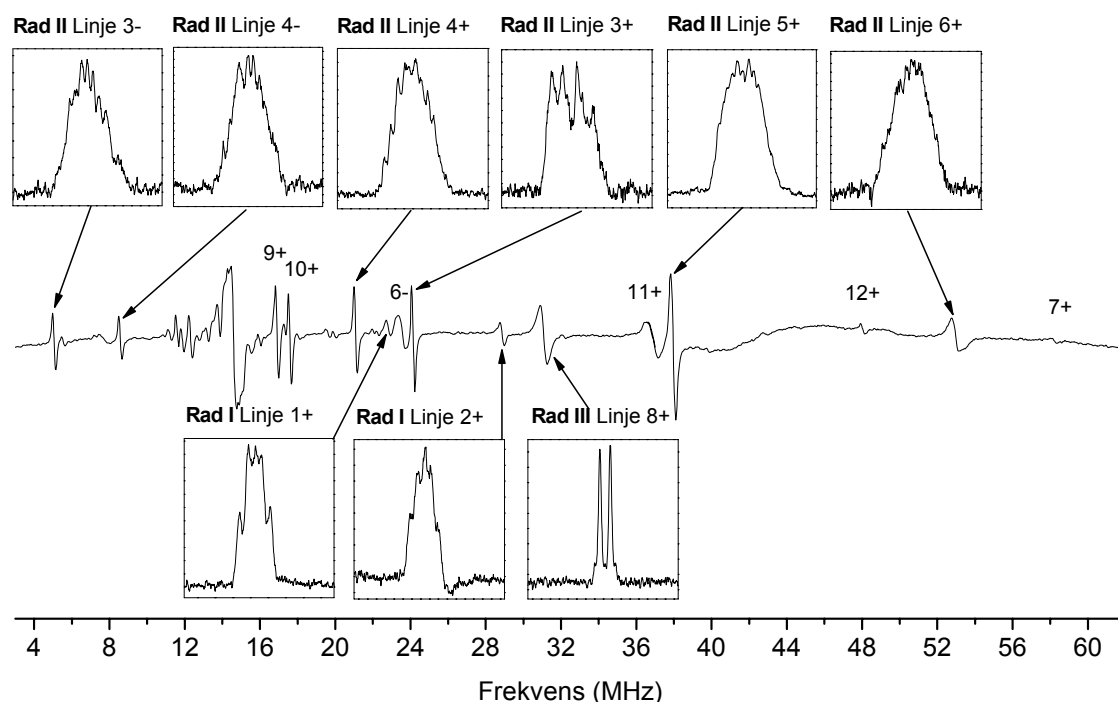
Å låse magnetfeltverdien til ulike resonanslinjer i EPR-spekteret og å undersøkje endringar i ENDOR-spektra kan og gje nyttig informasjon om kva ENDOR-resonansar som høyrer til kva radikal. Resonanslinje $3\pm$, $4\pm$, $5+$, $6+$, $9+$, $10+$ og $11+$ ser ut til å vere tilstades i

ENDOR-spekteret ved alle magnetfeltverdiar. Desse linjene er difor truleg knytte til eit eller fleire radikal med breie resonansar som dekkar heile EPR-spekteret (jamfør radikal II). Resonanslinje 1+, 2+ og 8+ ser derimot ut å forsvinne når magnetfeltet låsast på flankane i EPR-spekteret. Dette er ein indikasjon på at desse koplingane høyrer til radikal som gjev smalare resonansar i EPR-spekteret (jamfør radikal I og III). Kor vidt kopling 7+ og 12+ forsvinn frå ENDOR-spekteret når magnetfeltet vert låst til flankane eller om intensiteten til linjene berre vert veldig svak, er vanskeleg å avgjere.

Nokre av resonanslinjene i figur 4.5 ser ut til å ha vorte frekvensforskyvde i forhold til i figur 4.4. Dette gjeld særskilt resonanslinje $6\pm$ og $11+$. Slike frekvensforskyvingar kan skuldast ulike effektar. Både oppstilling (kavitert) og spesielt temperatur kan ha innverknad på resonansfrekvensen til ENDOR-resonanslinjer. Kopar vil, i motsetnad til glas, vere ein effektiv varmeleiar og krystallar monterte til koparstavar kan difor bli betydeleg meir oppvarma under ENDOR-målingar enn krystallar monterte på glasstavar. Temperatur kan ha innverknad på radikalstruktur og slike strukturelle endringar vil vidare kunne påverke dei ulike koplingane i radikalet. β -koplingar er spesielt følsame for slike effektar og det er ikkje uvanleg at koplingskonstantane og dermed resonansfrekvensane til slike koplingar endrar seg med endringar i temperatur. Føremålet med figur 4.5 er i alle høve å synleggjere endringane i ENDOR-spekteret ved endringar av friprotonfrekvensen. Dei eksakte linjeposisjonane er av mindre interesse i denne samanhengen.

Som skildra i avsnitt 2.3.3 gjev EIE EPR-absorpsjonsliknande spekter og ENDOR-resonanslinjer som høyrer til same radikal vil teoretisk gje like EIE-spekter. Figur 4.6 viser EIE-spekter for koplingane 1-6 og kopling 8. Spektra er tekne opp med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen for deuterte krystallar bestrålte ved 295 K og målte ved om lag 240 K. Kopling 1+ og 2+ har ved $\langle c^* \rangle$ -aksen EIE-spekter med ei halvverdibreidde på om lag 3,5 mT. Begge desse EIE-spektra har ein femlinjestruktur som kan samanliknast med dei fem resonanslinjene i senteret av $\langle b \rangle$ -aksespekteret i figur 4.2. Kopling 1+ og 2+ høyrer med andre ord truleg til radikal I. EIE-spektra for kopling $3\pm$, $4\pm$, $5+$ og $6+$ har ein breiare struktur med halvverdibreidde på rundt 6,3 mT langs $\langle c^* \rangle$ -aksen. Desse koplingane er rekna å høyre til radikal II, som dekkar heile breidda til EPR-spektra. Resonanslinje 8+ gjev opphav til ein dublett i EIE-spekteret. Dubletten er separert med 1,2 mT og samsvarer dubletten observert i $\langle c^* \rangle$ -aksespekteret i figur 4.2. Ei splitting $|a|$ på 1,2 mT gjev, frå likning 2.39, ENDOR-resonansfrekvensar ved om lag 2,2 og 31,4 MHz. Den eksperimentelle resonansfrekvensen til kopling 8+ er ved $\langle c^* \rangle$ -aksen 30,9 MHz. Den høgrekvente resonansfrekvensen berekna frå hyperfinsplittingskonstanten er med andre ord i samsvar med den målte resonansfrekvensen til kopling 8+. Vi har difor konkludert med at radikal III berre gjev opphav til ei oppløyst kopling, kopling 8. Andre eventuelle koplingar knytt til radikalet må vere små og berre gje bidrag til linjebreiddene.

Det let seg ikkje gjere å få tilfredstillande EIE-spekter for kopling 7+ og 12+, sannsynlegvis på grunn av dei svake ENDOR-intensitetane til koplingane. EIE-spektra til kopling 9+ og 10+ svarer ikkje til nokon av EIE-spektra til radikal I-III. Av ENDOR-spekteret i figur 4.6 kan det sjå ut som om kopling 10+ overlappar ei mindre intens resonanslinje og det same kan og sjå ut til å vere tilfelle for resonanslinje 9+. Slike overlappingar kan gje samansette EIE-spekter. I figur 4.5 er kopling 9+ og 10+ observerte i ENDOR-spektra ved alle magnetfeltverdiar og dette kan indikere at koplingane er knytte til radikal II. Det kan sjølvsagt og tenkast at kopling 9 og 10 høyrer til eit fjerde radikal. Men sidan resonanslinjene berre kan følgjast ved rotasjon om $\langle a \rangle$ -aksen har ein ikkje nok informasjon om koplingane til å kunne fastslå verken det eine eller det andre og EIE-spektra til koplingane er uteletne frå figur 4.6. EIE-strukturane til linje 6- og linje 11+ vert forstyrre av dei sterke intensitetane til høvesvis linje 4+ og linje 5+ og er heller ikkje viste i figur 4.6. Av figuren ser ein i tillegg at EIE-spekteret til linje 3+ vert noko forstyrre av kopling 6- ved den viste orienteringa.



Figur 4.6: 1.derivert ENDOR-spekter for ein deutert N-acetyl-L-tyrosin-krystall bestrålt ved romtemperatur (295 K) og målt ved om lag 240 K. Magnetfeltverdien er låst til ei av dei sentrale resonanslinjene i EPR-spekteret og magnetfeltet er retta parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen. EIE-spektra for ENDOR-resonanslinje 1-6 og 8 er viste i magnetfeltintervallet 332,5-349,5 mT. Resten av ENDOR-resonanslinjene markerte i figuren gav ikkje tilfredstillande EIE-signal. På bakgrunn av linjeform og spekterbreidde, er kopling 1-2 sortert til radikal I, kopling 3-6 til radikal II og kopling 8 til radikal III.

Før den vidare analysen av radikal I, II og III vert det gjeve eit kort samandrag av dei førebelse resultata. EPR- og EIE-spektra viser at minst tre ulike radikal gjev bidrag til den samla resonansen ved romtemperatur. ENDOR-resonanslinje 1+ og 2+ er sorterte til radikal I som har ei breidde på om lag 3,5 mT med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen. EIE-spektra til resonanslinje 1+ og 2+ ser ut til å vere samansett av fem resonanslinjer som svarer til dei fem resonanslinjene i senteret av EPR-spekteret med magnetfeltet langs $\langle b \rangle$ -aksen. Resonanslinjene til 1+ og 2+ er ikkje synlege i ENDOR-spekteret med magnetfeltet låst på flankane i EPR-spekteret.

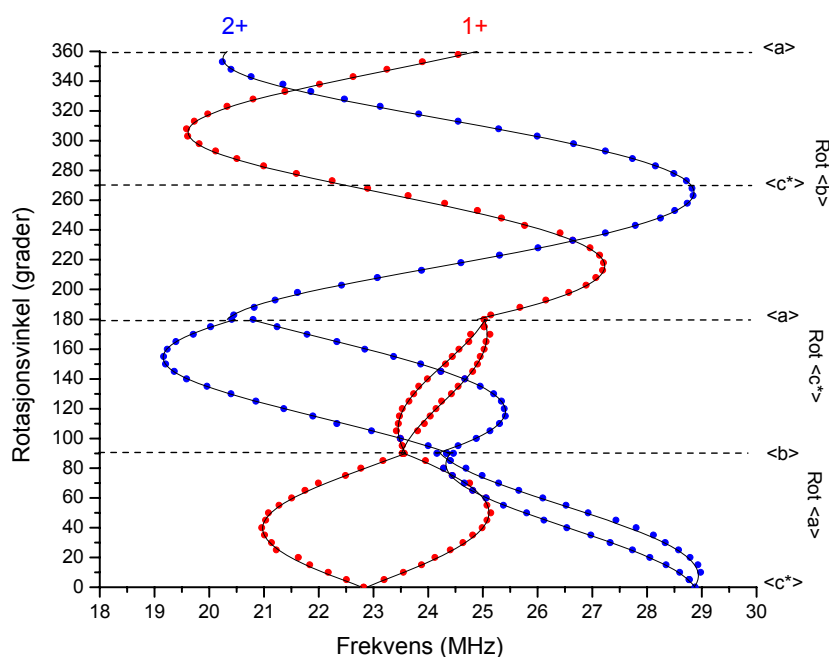
ENDOR-resonanslinje 3-6 er knytte til radikal II som har ei total breidde på rundt 6,3 mT langs $\langle c^* \rangle$ -aksen som svarer til dei breiaste resonansane i EPR-spekteret. Resonanslinje 3-6 er tilstades i ENDOR-spekteret med magnetfeltet låst både til flankane og i senteret av EPR-spekteret.

Dubletten i EPR-spekteret med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen er knytt til radikal III, som gjev opphav til kopling 8. EIE-spekteret for denne koplinga viser den same dubletten splitta med 1,2 mT.

Resten av koplingane i figur 4.4 har det ikkje lukkast å sortere til bestemte radikal. Hyperfinkoplingstensen til kopling 7+ er oppgjeven i appendiks C. Tensen ser ut til å ha β -form med isotropverdi på 84,7 MHz. Det er ikkje avgjort om koplinga er synleg i ENDOR-spektra med magnetfeltet låst til flankane i EPR-spekteret og ein har heller ikkje noko EIE-spekter å gå ut frå for denne koplinga. Koplingane 9-12 let seg berre observere i enkelte rotasjonsplan og ein har difor ikkje hyperfinkoplingstensorar for desse koplingane. Kopling 9, 10 og 11 er synlege i ENDOR-spekteret med magnetfeltet låst både i senteret og på flankane i EPR-spekteret. For kopling 12 gjev tilsvarende undersøkingar ikkje klare resultat. Ingen av koplingane 9-12 gjev eintydige EIE-spekter. I den vidare analysen vert radikal I-III med tilhøyrande koplingar analyserte og radikalstrukturane vert forsøkt identifiserte.

4.3 Radikal I

Figur 4.7 viser den angulære variasjonen for ENDOR-linjene til kopling 1+ og 2+ knytt til radikal I, i tre rotasjonsplan. Punkta markerer eksperimentelle frekvensar for dei to høgfrekvente linjene 1+ og 2+. Ut i frå dei eksperimentelle datapunkta vart to hyperfinkoplingstensorar berekna og tensorane er lista i tabell 4.1. For kvar kopling er det to Schonland-variantar av hyperfinkoplingsmatrisene. Det er ikkje gjort noko eksperimentelt forsøk på å løyse denne tvitydnaden, men det viser seg at for kopling 1+ og 2+ er skilnadane mellom dei to variantane så små at dei for alle praktiske formål kan neglisjerast. Det vil i tillegg vere to moglege kombinasjonar på forteikna til eigenvektorane i kvar matrise. Dei to kombinasjonane høyrer høvesvis til kvart sitt molekyl i einingscella og tabell 4.1 viser den eine av desse kombinasjonane for kvar kopling. Den andre forteiknskombinasjonen kan etablerast ved å snu forteiknet på eigenvektorane langs $\langle b \rangle$ -aksen. Frå tensorane i tabell 4.1 kan variasjonane til ENDOR-linjeposisjonane for dei ulike koplingane bereknast og desse er viste som heiltrekte kurver i figur 4.7.



Figur 4.7: Observerte variasjonar i ENDOR-resonansfrekvensar for kopling 1+ og 2+ knytt til radikal I observert i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur og målte ved om lag 240 K. Dei heiltrekte kurvene viser frekvensvariasjonane til ENDOR-linjene berekna frå tensorane i tabell 4.1.

Tabell 4.1: Hyperfinkoplingstensorar for kopling 1+ og 2+ knytt til **radikal I** observert i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur og nedkjølte til ca. 240 K under målingane. Tala i parentes representerer standardavviket til det siste talet i den lista verdien.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar			$\Delta\psi^a$ (grader)
				<a>		<c*>	
1+	-18,20 (1)	9,13 (2)	-9,07 (2)	0,471 (1)	0,415 (2)	0,777 (1)	6,7/2
		-1,10 (2)	-19,30 (2)	-0,397 (2)	0,888 (1)	-0,232 (1)	2,8/1
		-8,02 (2)	-26,22 (2)	0,786 (1)	0,415 (2)	-0,586 (1)	
2+	-19,83 (1)	10,69 (2)	-9,14 (2)	-0,894 (0)	-0,440 (2)	0,085 (1)	4,8/3
		-1,76 (2)	-21,59 (2)	-0,447 (2)	0,891 (0)	-0,082 (1)	6,3/1
		-8,92 (2)	-28,75 (2)	0,039 (1)	0,111 (1)	0,993 (0)	
Molekylære referansevektorar ^b :							
1. Perpendikulært til den aromatiske ringen				-0,408	0,894	-0,184	
2. Bindingsretninga C6-H6				0,553	0,334	0,763	
3. Bindingsretninga C8-H8				-0,901	-0,404	0,161	

^a Dette er vinkelavviket mellom eigenvektoren og ein av dei molekylære referansevektoranane. Talet til høgre (1/2/3) markerer kva for ein av referansevektoranane avviket gjeld for.

^b Referansevektoranane er berekna frå krystallstrukturen, sjå appendiks A.

4.3.1 Analyse av koplingar, radikal I

Av tabell 4.1 ser det ut som at både kopling 1+ og kopling 2+ har prinsipalverdiar på form av α -koplingar (jamfør likning 2.30). For ei regulær, karbonsentrert α -kopling vil eigenvektoren til prinsipalverdien med minst absoluttverdi (t_{\min}^{α}), ligge nær den krystallografiske retninga til C_{α} -H $_{\alpha}$ -bindinga. Eigenvektoren til den intermediære prinsipalverdien (t_{int}^{α}) vil ligge nær retninga til $2p_z$ -orbitalen på C_{α} . Ved å samanlikne dei eksperimentelle eigenvektoranane med krystallografiske retningar (sjå appendiks A) kan ein få ein indikasjon på kvar i molekylet dei ulike vekselverknadane kan finne stad. Tabell 4.1 viser at t_{\min}^{α} til kopling 1+ har eit godt samsvar med den krystallografiske C6-H6-retninga i eit uskadd N-acetyl-L-tyrosin-molekyl (sjå figur 3.1 b)), med eit vinkelavvik på om lag $6,7^{\circ}$. For kopling 2+ ligg eigenvektoren t_{\min}^{α} svært nær den krystallografiske retninga til C8-H8-bindinga og vinkelavviket mellom desse to retningane er rundt $4,8^{\circ}$.

Tabell 4.1 listar og ein referansevektor perpendikulært på den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin. Denne vektoren er utrekna frå krystallografiske retningar i appendiks A. Som vi ser av tabellen er det eit godt samsvar mellom dei eksperimentelle t_{int}^{α} for begge koplingane og denne ringnormalen med vinkelavvik på $2,8^{\circ}$ og $6,3^{\circ}$. Dette er med på å støtte opp under at både kopling 1+ og kopling 2+ er knytte til den aromatiske ringen og det synast som ei rimeleg hypotese å knyte kopling 1+ til H6 og kopling 2+ til H8.

Frå McConnell sin relasjon i likning 2.29 kan dei eksperimentelle spinntettleikane for dei to koplingane bereknast. For nøytrale molekyl nyttast gjerne ein Q_{CH} -verdi på -2,6 mT som svarer til -72,8 mT (Bernhard, 1981). Med isotropverdien til kopling 1+ som utgangspunkt gjev dette ein spinntettleik på $\rho^\pi \approx 0,25$ på det sentrale karbonatomet. For kopling 2+ vert den tilsvarende spinntettleiken $\rho^\pi \approx 0,27$.

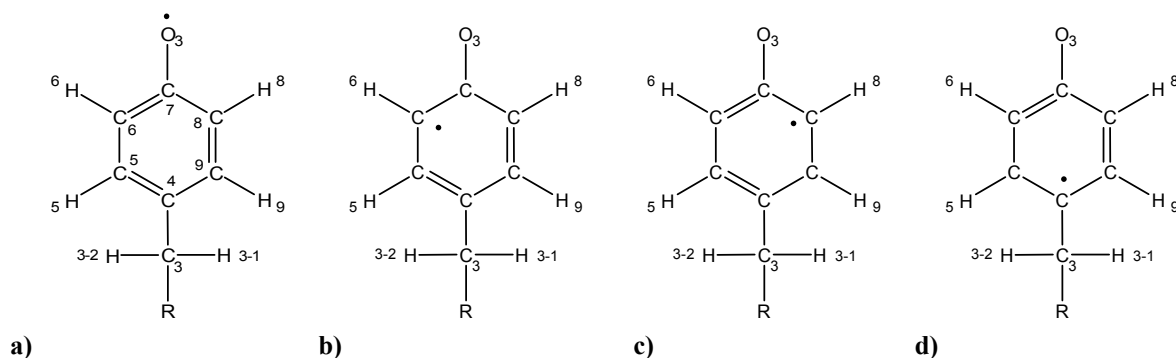
Spinntettleiken på C_α kan og bereknast frå dipolledet til ei α -kopling, sjå Gordy si likning 2.31. Med Q_z^{dip} sett til 38,7 MHz gjev denne likninga ein spinntettleik på 0,24 for den mest positive anisotrope verdien til kopling 1+. Tilsvarende berekningar for kopling 2+ gjev ein spinntettleik på 0,28. Det gode samsvaret mellom spinntettleiken berekna frå McConnell og Gordy sine likningar tyder på at bindingsfragmenta til både kopling 1+ og kopling 2+ er tilnærma plane.

I figur 4.2 vart det i $\langle b \rangle$ -aksespekteret målt ei splitting a_1 på 0,68 mT som tilsvarende 19,2 MHz. Frå likningane i kapittel 2.3.2 gjev ei slik splitting ENDOR-resonansfrekvensar ved 5,0 og 24,2 MHz. I ENDOR-spekteret med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen er resonanslinje 1+ observert ved 23,5 MHz og resonanslinje 2+ ved 24,2 MHz. Det er difor gått ut frå at dei to nær ekvivalente koplingane 1+ og 2+, gjev opphav til splittinga markert som a_1 i figur 4.2.

4.3.2 Kandidat til radikal I: Tyrosylradikal

Tyrosylradikalet skissert i figur 4.8 er ein kandidat til radikal I ved romtemperatur. Liknande tyrosylradikal er kjent frå andre system, som til dømes i krystallar av L-tyrosin-hydroklorin bestrålte med γ -stråling (Fasanella og Gordy, 1969). Den same radikalstrukturen er og foreslått danna i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur med γ -stråling frå ei ^{60}Co -kjelde (Mezetti *et. al.*, 1999).

For å få danna tyrosylradikalet i figur 4.8 a) må N-acetyl-L-tyrosin-molekylet oksiderast ved ein netto abstraksjon av H(O3), sjå figur 6.1. Sidan den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin er tilnærma plan kan ein gå ut frå at eit upara spinn på O3 vert delokalisert etter mønsteret vist i figur 4.8 a)-d). Hyperfinstrukturen for tyrosylradikalet vil difor truleg innehalde bidrag frå alle desse fire radikalstrukturane. Dette er i samsvar med analysen i førre kapittel, der kopling 1+ vart knytt til proton H6 (figur 4.8 b) medan kopling 2+ vart knytt til proton H8 (figur 4.8 c).



Figur 4.8: Strukturen til eit tyrosylradikal som er danna ved ein oksidasjon av OH-gruppa bunde til den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin. Hyperfinstrukturen for eit tyrosylradikal vil vere ein hybrid av radikalstrukturane a)-d). R markerer karboksylgruppa, peptidbindinga og acetylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin-molekylet, sjå til dømes figur 3.1 b).

Fasanella og Gordy (1969) har ved hjelp av Mc Lachlan *self-consistent field* (SCF)-teori berekna dei teoretiske spinntettleikane i tyrosylringen til å vere $\rho(C4) = 0,31$, $\rho(C5) = -0,02$, $\rho(C6) = 0,26$, $\rho(C7) = -0,03$, $\rho(C8) = 0,26$, $\rho(C9) = -0,07$ og $\rho(O3) = 0,28$. I kapittel 4.3.1 vart dei eksperimentelle spinntettleikane til kopling 1+ og 2+ berekna til vere høvesvis 0,25 og 0,27 frå McConnell si likning. Dei teoretisk berekna (SCF) spinntettleikane på 0,26 for C6 og C8 har eit godt samsvar med dei eksperimentelle spinntettleikane og støttar slik opp om at radikal I er eit tyrosylradikal.

Figur 4.8 d) viser at ein for tyrosylradikalet vil forvente ein viss spinntettleik på C4 som gjev grunnlag for β -koplingar til H(3-1) og H(3-2). Det viser seg av krystallstrukturen i appendiks A, at H(3-2) berre er $3,8^\circ$ frå å ligge same plan som den aromatiske ringen.

Hyperkonjugasjonen mellom dette protonet og eit upara spinn i $2p_z$ -orbitalen på C4 vil difor verte liten. H(3-1) har derimot ein dihedralvinkel på $26,0^\circ$ i forhold til $2p_z$ -orbitalen på C4 og dette legg forholda til rette for ei større kopling til eit upara spinn på C4. I $\langle b \rangle$ -aksespekteret i figur 4.2 vart det observert ei splitting a_2 på 42,1 MHz. Denne splittinga stammar sannsynlegvis frå β -koplinga til H(3-1). Ein splitting på 42,1 MHz langs $\langle b \rangle$ -aksen vil av likning 2.39 gje linjeposisjonar rundt 6,5 MHz og 35,7 MHz. I ENDOR-spekteret teke opp med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen er den intense resonanslinja til kopling 5+ (radikal II) observert ved 35,9 MHz og denne linja vil overlappe ei potensiell resonanslinje knytt til H(3-1) ved denne orienteringa. Ved andre orienteringar har kopling 11+ vorte observert ved frekvensar rundt 36 MHz, sjå til dømes figur 4.4, men denne resonanslinja er synleg i ENDOR-spektra med magnetfeltet låst på flankane i EPR-spekteret og kan difor ikkje knytast til radikal I. Heller ikkje den lågfrekvente greina av koplinga til H(3-1) har vorte observert i ENDOR-spektra i dette arbeidet. Hyperfintensoren til H(3-1) er difor ikkje bestemt eksperimentelt, men koplinga til H(3-1) er observert i EPR-spektra, sjå til dømes figur 4.2.

4.3.3 DFT-berekingar for tyrosylradikal

Ved hjelp av DFT (Frisch *et al.*, 2004) kan ein finne optimal radikalstruktur samt spinntettleikar og hyperfinmatriser for det optimaliserte radikalet. Desse teoretiske resultata for eit føreslått radikal kan så samanliknast med dei tilsvarande eksperimentelle resultata. Sjå kapittel 3.7 for nærare skildring av DFT.

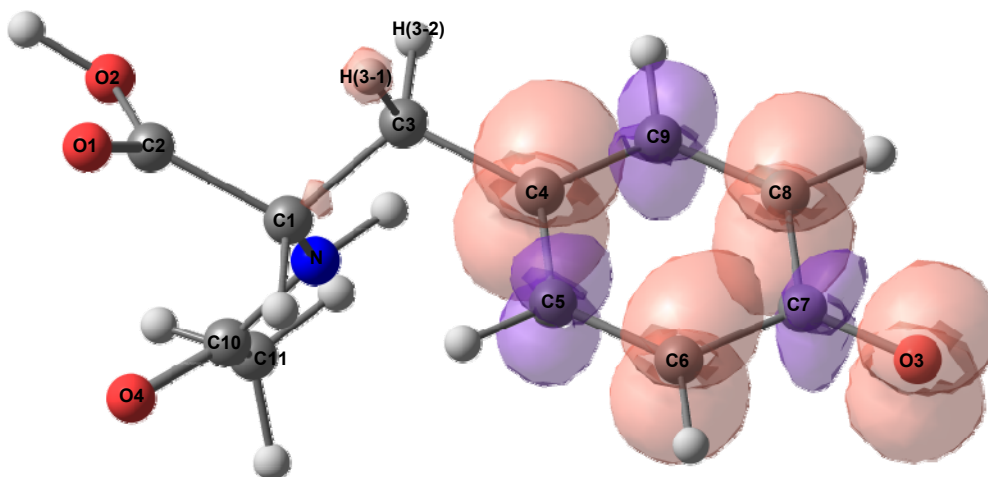
I denne oppgåva har DFT-berekingane vorte gjort på enkle molekyl. I ein einkrystall vil det vere mange molekyl som i ulik grad vil påverke einannan og DFT-berekingar på isolerte molekyl vil difor representere ei forenkling av dei reelle forholda for eit molekyl i ein einkrystall. For best mogleg å simulere molekyl i einkrystallar, låser ein gjerne visse molekylkoordinatar, slik at radikala ikkje får optimalisere heilt fritt. Men det vil likevel vere venta eit visst avvik mellom hyperfintensorar berekna ved hjelp av DFT og dei eksperimentelle hyperfintensorane.

For tyrosylradikalet vist i figur 4.8, er den opphavelge molekylstrukturen frå krystallografiske data nytta som utgangspunkt for optimaliseringa. Ved å fjerne H(O3) frå den opphavelge molekylstrukturen, får ein danna det føreslåtte tyrosylradikalet. I berekingane har torsjonsvinklane til H(3-1), H(3-2), H5, H6, H8, H9 og O3, samt alle bindingsvinklar og alle bindingslengder, fått optimalisere fritt. Torsjonsvinklane i resten av radikalet er sett som konstanter. Dette vil truleg lette berekingane noko. Tabell 4.2 viser dei DFT-berekna hyperfintensorane for det føreslåtte tyrosylradikalet.

Frå DFT-berekingane kan ein og få informasjon om korleis spinntettleiken fordelar seg over radikalet. Figur 4.9 viser isospinntettleikane for tyrosylradikalet. Dei plotta sfærane representerer punkt med lik spinntettleik, ikkje ulikt høgdekurver på eit kart. Konturverdien som er oppgjeven i figurteksten definerar grenseverdien (i atomære einingar) til den viste isospinnoverflata. Dei raude sfærane markerer positiv spinntettleik medan dei lilla sfærane markerer negativ spinntettleik. Ikkje overraskande er det positive spinnet lokalisert på O3, C4, C6 og C8 for eit slikt tyrosylradikal. Figuren viser og at C5 og C9 får induert ein negativ spinntettleik som gjev opphav til allylliknande koplingar til H5 og H9. I tillegg ser ein av figuren at H(3-1) får induert positiv spinntettleik som vil gje opphav til ei relativt stor β -kopling. H(3-2) ligg som forventa om lag i nodalplanet til $2p_z$ -orbitalen på C4 og β -koplinga til denne vert difor lita (sjå tabell 4.2).

Tabell 4.2: DFT-berekna hyperfinkoplingstensorar for **tyrosylradikalet** foreslått danna i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 295 K. Radikalet er etablert ved å fjerne H(O3) frå den uskadde molekylstrukturen (appendiks A). Torsjonsvinklane til H(3-1), H(3-2), H5, H6, H8, H9 og O3 er sett til å vere variable i likskap med alle bindingsvinklar og alle bindingslengder i radikalet. Resten av torsjonsvinklane i radikalet er sett som konstante for å lette rekningane noko.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H6 (DFT)	-16,75	10,68	-6,07	0,577	0,392	0,716
		-2,08	-18,83	-0,411	0,898	-0,16
		-8,6	-25,35	0,706	0,202	-0,679
H8 (DFT)	-18,5	11,72	-6,78	0,907	0,42	-0,013
		-2,06	-20,56	-0,416	0,894	-0,167
		-9,66	-28,16	-0,058	0,157	0,986
H5 (DFT)	6,81	3,78	10,59	0,183	0,27	0,945
		-0,82	5,99	-0,872	-0,4	0,283
		-2,96	3,85	-0,454	0,876	-0,162
H9 (DFT)	6,81	3,77	10,58	0,838	0,296	-0,458
		-0,73	6,08	0,358	0,335	0,872
		-3,04	3,77	-0,411	0,895	-0,175
H(3-1) (DFT)	44,52	3,76	48,28	0,725	-0,282	-0,628
		-1,32	43,20	0,389	-0,584	0,712
		-2,44	42,08	0,568	0,761	0,314
H(3-2) (DFT)	1,51	3,57	5,08	-0,033	0,217	0,977
		-1,54	-0,03	-0,386	0,898	-0,213
		-2,03	-0,52	0,922	0,384	-0,055



Figur 4.9: Fordeling av positiv (raud) og negativ (lilla) isospinntettleik i tyrosylradikalet (radikal I) foreslått danna ved abstraksjon av H(O3) i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur. Spinntettleikane er henta ut frå DFT-berekningane. Konturverdien er 0,003782 a. u. for dei viste spinnoverflatene.

Samanliknar ein tensorane frå DFT-berekningane (tabell 4.2) og dei eksperimentelle tensorane i tabell 4.1 ser ein eit godt samsvar mellom tensorane H6 og 1+, samt tensorane H8 og 2+. DFT-berekningane gjev noko mindre isotropverdiar enn det som er observert eksperimentelt. I tillegg er dei anisotrope verdiane meir aksialsymmetriske i H6- og H8-tensorane enn i dei eksperimentelle tensorane 1+ og 2+. Avviket mellom t_{\min}^{α} , t_{int}^{α} og t_{maks}^{α} til den eksperimentelle tensoren 1+ og t_{\min}^{α} , t_{int}^{α} og t_{maks}^{α} til den DFT-berekna H6-tensoren, er høvesvis $6,5^{\circ}$, $5,4^{\circ}$ og $8,3^{\circ}$. Ei tilsvarande samanlikning mellom tensorane 2+ og H8 gjev avvik for t_{\min}^{α} , t_{int}^{α} og t_{maks}^{α} på høvesvis $3,9^{\circ}$, $4,8^{\circ}$ og $5,6^{\circ}$. DFT-berekningane gjev β -koplingar til H(3-1) og H(3-2) med isotropverdiar på 44,52 MHz og 1,51 MHz. Den vesle koplinga til H(3-1) vil eventuelt berre gje bidrag til linjebreiddene i EPR-spektra. Isotropverdien på 44,52 MHz for kopling H(3-1) i tabell 4.2 kan jamførast med den eksperimentelt målte splittinga $a_2 \approx 42,1$ MHz i $\langle b \rangle$ -aksespekteret i figur 4.2 og det synast rimeleg at denne splittinga stammar frå ei kopling til H(3-1) i tyrosylradikalet.

Kopling H5 og H9 frå tabell 4.2 representerer allylliknande koplingar i tyrosylradikalet. Allylkoplingar har karakteristisk oppførsel. Isotropverdien er positiv og vil berre vere ca. 1/3 så stor som for nabo- α -koplingane. At isotropverdien er positiv tyder at spinntettleiken på det sentrale karbonatomet er negativ. I tillegg vil retningane til prinspalverdiane med minst og intermediær absoluttverdi ha "bytt plass" samanlikna med retningane til ei ordinær α -kopling. Det vil altså seie at for ei allylkopling vil den intermediære prinspalverdien ha retning nær retninga til C_{α} -H $_{\alpha}$ -bindinga, medan retninga til den minste prinspalverdien vil vere nær retninga til $2p_z$ -orbitalen på C_{α} . Heller og Cole viste ved sine studiar på glutakonsyre at dette omskiftet i retningar skuldast dipolare vekselverknadar mellom H $_{\alpha}$ -protonet og store positive spinntettleikar på nabokarbonatoma (Heller og Cole, 1962). Dersom ein tek utgangspunkt i likningane i kapittel 2.3.2 kan ein estimere teoretiske linjeposisjonar for allylkoplingane H5/H9 frå DFT. Ei splitting på om lag 10,6 MHz langs $\langle c^* \rangle$ -aksen (jamfør H5 i tabell 4.2) vil gje resonanslinjer rundt 9,3 og 19,9 MHz. I ENDOR-spektret i figur 4.4 er det observert to resonanslinjer ved 19,6 og 20,0 MHz som kan vere alternativ til allylkoplingane H5/H9. Det er og fleire andre resonanslinjer i frekvensområdet 8-20 MHz i $\langle c^* \rangle$ -aksespekteret som kan vere moglege kandidatar til allylkoplingane H5/H9, men ingen av desse resonanslinjene har lete seg følgje gjennom heile plan.

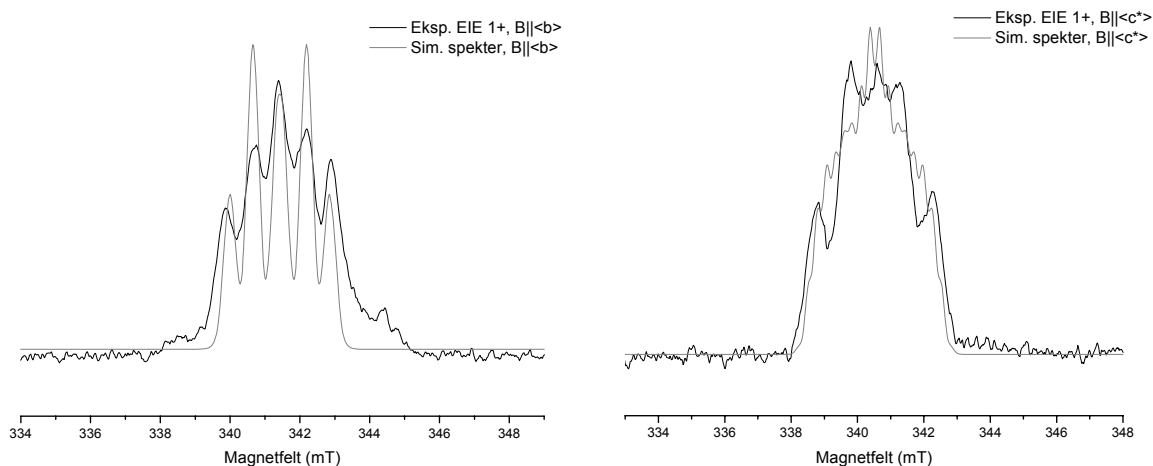
Oppsummert har DFT-berekningane for tyrosylradikalet eit godt samsvar med dei eksperimentelle data for radikal I og berekningane støttar slik den føreslåtte modellen.

4.3.4 Simuleringar radikal I

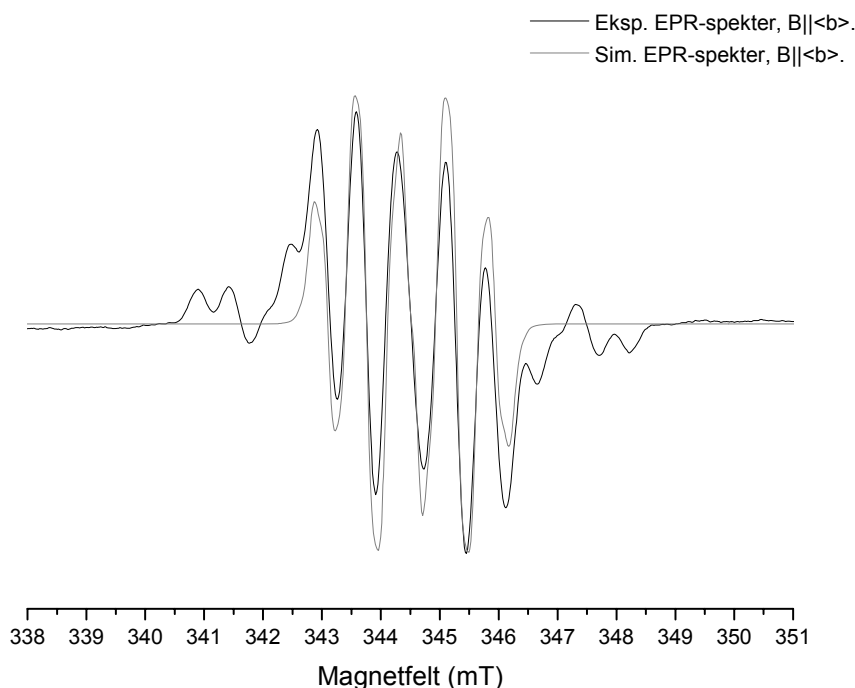
Ved hjelp av simuleringsprogrammet KVASAT (Lund *et. al.*, 1978; Sagstuen *et al.*, 2000) er det mogleg å simulere EPR-absorpsjonsspekter på bakgrunn av gjevne prinsipalverdiar og eigenvektorar. Dei svarte spektra i figur 4.10 viser EIE-signalet for den eksperimentelt observerte kopling 1+ (knytt til radikal I) ved $\langle b \rangle$ -aksen og $\langle c^* \rangle$ -aksen. Dei grå spektra i figur 4.10 er simulerte EPR-absorpsjonsspekter med utgangspunkt i dei to eksperimentelle tensorane frå tabell 4.1 i tillegg til dei DFT-berekna tensorane H5, H9, H(3-1) og H(3-2) frå tabell 4.2. Jamt over er det eit godt samsvar mellom dei eksperimentelle EIE-spektra og dei simulerte spektra. $\langle b \rangle$ -aksespektra viser at simuleringane reproduserar dei fem resonanslinjene frå radikal I, men at breidda til det simulerte spekteret er noko mindre enn breidda til det eksperimentelle EIE-spektret. I $\langle c^* \rangle$ -aksespektra reproduserar simuleringa breidda betre, men linjeforma til det simulerte spekteret ser ut til å avvike noko frå det eksperimentelle EIE-spekteret. Av tabell 4.1 og 4.2 kan ein merke seg at begge dei DFT-berekna tensorane H6 og H8 er noko mindre enn dei eksperimentelle tensorane 1+ og 2+. Dei andre tensorane frå tabell 4.2 vil sannsynlegvis og ha eit visst avvik frå dei eksperimentelt forventa tensorane. Dette er ei mogleg årsak til dei små avvika mellom dei simulerte absorpsjonsspektra og dei eksperimentelle EIE-spektra. Eit EIE-spekter er dessutan eit delvis metta EPR-spekter og EIE-spekteret kan i motsetnad til eit EPR-spekter verte påverka av relaksasjonsprosessar. Desse faktorane kan vidare påverke både intensiteten til EIE-resonanslinjene og den totale breidda til EIE-spekteret og dermed vere medverkande årsak til avvika mellom dei eksperimentelle EIE-spektra og dei simulerte absorpsjonsspektra i figur 4.10.

Figur 4.11 samanliknar det eksperimentelle 1. deriverte EPR-spekteret med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen for ein ikkje-deutert krystall (svart spekter) og det simulerte 1. deriverte absorpsjonsspekteret for dei same tensorane som i figur 4.10 (grått spekter). Figuren viser at dei simulerte resonanslinjene frå tyrosylradikalet har eit godt samsvar med dei fem resonanslinjene i senteret av det eksperimentelle EPR-spekteret teke opp med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen.

Tyrosylradikalet som potensiell kandidat for radikal I observert i N-acetyl-L-tyrosin ved romtemperatur, er basert på det gode samsvaret mellom dei eksperimentelle tensorane og dei forventa krystallografiske retningane til tyrosylradikalet. Både DFT-berekningane og simuleringane støttar opp om modellen og det synast rimeleg å identifisere radikal I som eit tyrosylradikal. I kapittel 6 vert resultata for radikal I oppsummerte og ein mogleg dannelsesmekanisme for tyrosylradikalet vert skissert.



Figur 4.10: Dei svarte spektra er dei eksperimentelle EIE-spektra for kopling 1+ observerte i deutrerde krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur og målte ved 240 K. Dei grå spektra er simulerte EPR-absorpsjonsspekter med utgangspunkt i dei eksperimentelle koplingane 1+ og 2+ frå tabell 4.1, i tillegg til dei DFT-berekna tensorane H5, H9, H(3-1) og H(3-2) frå tabell 4.2. I spektra til venstre er magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen medan magnetfeltet er retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen i spektra til høgre.

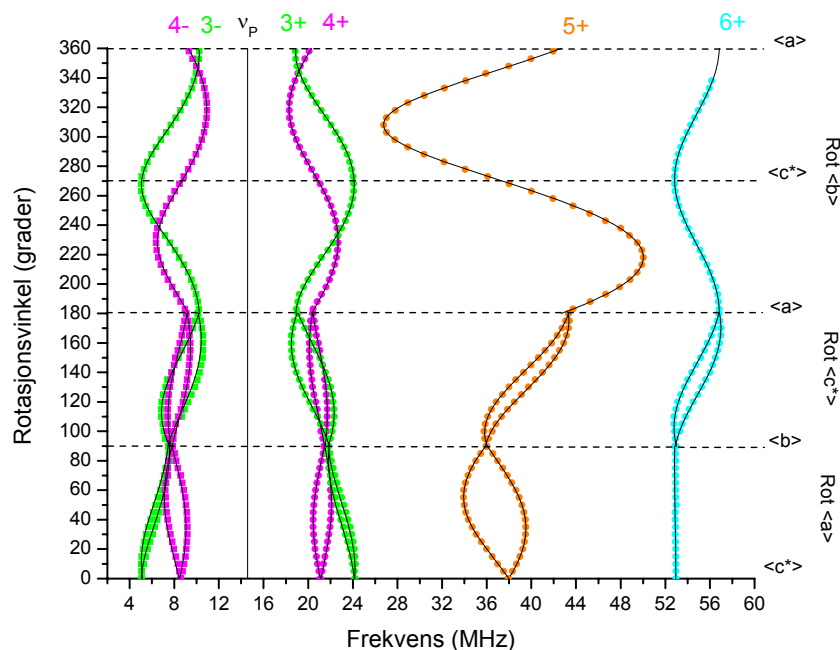


Figur 4.11: Det svarte spekteret er det eksperimentelle 1.deriverte EPR-spekteret for ein ikkje-deutrerde krystall bestrålt ved romtemperatur og målt ved 240 K. Mikrobølgefrequensen er 9,6420 GHz. Det grå spekteret er det simulerte 1.deriverte absorpsjonsspekteret med utgangspunkt i kopling 1+ og 2+ frå tabell 4.1, i tillegg til kopling H5, H9, H(3-1) og H(3-2) frå tabell 4.2. Magnetfeltet er i begge spektra retta langs $\langle b \rangle$ -aksen.

4.4 Radikal II

Figur 4.12 viser dei angulære variasjonane til ENDOR-resonansfrekvensen for koplingane $3\pm$, $4\pm$, $5+$ og $6+$ som er observerte i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin etter bestråling ved romtemperatur. Som følgje av analysen i kapittel 4.2 er det gått ut frå at desse koplingane høyrer til radikal II.

For dei relativt små koplingane 3 og 4 kunne både dei lågfrekvente (firkantar) og dei høgfrekvente (sirkclar) greinene av koplingane følgjast i tre rotasjonsplan. For dei større koplingane, $5+$ og $6+$, let berre den høgfrekvente greina seg observere i dei same tre plana. Ved hjelp av dei eksperimentelle resonansfrekvensane til dei ulike koplingane vart hyperfinkoplingstensorarane berekna. Desse er lista i tabell 4.3. Som for kopling $1+$ og $2+$ er skilnadane mellom Schonlandvariantane for kopling 3-6 små og berre ein av variantane er lista for kvar kopling. Frå tensorane vart variasjonane i ENDOR-resonansfrekvensane berekna og desse er gjevne som heiltrekte kurver i figur 4.12.



Figur 4.12: Observerte variasjonar i ENDOR-resonansfrekvensar for kopling 3-6 knytt til radikal II observert i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur og målte ved om lag 240 K. Friprotonfrekvensen er markert med $\nu_p \approx 14,6$ MHz. Dei heiltrekte kurvene viser frekvensvariasjonane til ENDOR-resonanslinjene berekna frå tensorane i tabell 4.3.

Tabell 4.3: Hyperfinkoplingstensorar for kopling 3-6 knytt til **radikal II** observert i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur og nedkjølte til ca. 240 K under målingane. Tala i parentes representerer standardavviket til det siste talet i den lista verdien.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinspalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
3-	-14,06 (1)	6,02 (2)	-8,04 (2)	0,949 (0)	0,312 (3)	-0,045 (2)
		-1,00 (2)	-15,06 (2)	-0,316 (3)	0,943 (1)	-0,105 (3)
		-5,01 (2)	-19,07 (2)	-0,010 (2)	-0,114 (3)	-0,993 (1)
3+	-14,15 (1)	6,34 (2)	-7,81 (2)	0,933 (1)	0,359 (4)	0,021 (1)
		-1,20 (2)	-15,35 (2)	-0,348 (3)	0,915 (1)	-0,207 (1)
		-5,14 (2)	-19,29 (2)	0,094 (2)	-0,186 (1)	-0,978 (1)
4-	-12,41 (2)	5,77 (4)	-6,64 (3)	-0,705 (1)	-0,316 (10)	-0,635 (1)
		-1,99 (4)	-14,40 (3)	-0,333 (13)	0,938 (2)	-0,097 (3)
		-3,79 (4)	-16,20 (3)	-0,626 (4)	-0,143 (9)	0,766 (1)
4+	-12,57 (1)	5,48 (2)	-7,09 (2)	-0,724 (1)	-0,282 (5)	-0,630 (1)
		-1,70 (2)	-14,27 (2)	-0,342 (6)	0,939 (1)	-0,028 (2)
		-3,77 (2)	-16,34 (2)	-0,599 (2)	-0,195 (4)	0,776 (1)
5+	-46,44 (1)	22,09 (3)	-24,35 (3)	-0,606 (0)	-0,210 (1)	-0,767 (0)
		-3,67 (2)	-42,77 (2)	-0,233 (1)	0,969 (0)	-0,081 (1)
		-25,76 (3)	-72,21 (3)	0,760 (0)	0,130 (1)	-0,637 (1)
6+	79,24 (1)	5,58 (2)	84,82 (2)	0,981 (0)	0,193 (17)	-0,023 (9)
		-2,72 (3)	76,52 (3)	0,092 (1)	-0,358 (91)	0,929 (36)
		-2,86 (2)	76,38 (2)	0,171 (1)	-0,913 (37)	-0,369 (92)

Breidda til eit EIE-spekter langs eit spesifikk orientering vil vere representativ for summen av hyperfinsplittingane til dei ulike koplingane som gjev bidrag til EIE-spekteret langs denne orienteringa. Langs <c*>-aksen er summen av hyperfinsplittingane til kopling 3-6 om lag 5,5 mT. EIE-spekteret til radikal II har langs <c*>-aksen ei halvverdibreidde på om lag 6,3 mT. Dette indikerar at det ytterligare må vere ei eller fleire koplingar knytt til radikal II som totalt langs <c*>-aksen gjev eit bidrag på rundt 0,8 mT. Frå kapittel 2.3.2 gjev ei splitting på 0,8 mT ENDOR-linjeposisjonar ved om lag 3,4 og 25,8 MHz. I <c*>-aksespektra i dette arbeidet er det ikkje observert ENDOR-resonanslinjer ved desse posisjonane. Mezetti *et al.* (1999) har i sine romtemperaturstudiar av bestrålte N-acetyl-L-tyrosin-krystallar, observert nær identiske koplingar til dei i tabell 4.3. Men i tillegg til desse fire koplingane har Mezetti *et al.* (1999) observert ei β -kopling med ein isotropverdi på 47,4 MHz (16,9 mT) som dei meiner må vere knytt til radikal II. Dei eksperimentelle EPR- og EIE-spektra for radikal II vart forsøkt simulerte med denne koplinga, i tillegg til kopling 3-6 frå tabell 4.3. Dette resulterte i at dei simulerte spektra vart breiare enn dei eksperimentelt observerte spektra. Også strukturmessig var det store forskjellar mellom dei simulerte og dei eksperimentelle spektra. Av desse analysane synast ikkje ei β -kopling på 47,4 MHz å høyre til radikal II.

Den vidare analysen vil i hovudsak dreie seg om koplingane 3-6 i tabell 4.3, men det er viktig å hugse på at det må vere ei eller fleire koplingar, i tillegg til desse fire observerte koplingane, som gjev bidrag til den samla resonansen for radikal II ved romtemperatur.

4.4.1 Analyse av koplingar, radikal II

Frå tabell 4.3 ser både kopling $3\pm$ og $4\pm$ ut til å ha prinsipalelement på ei form som indikerar α -koplingar. Mezetti *et al.* (1999) har riktig nok analysert kopling $4\pm$ som ei allyltype kopling med positive prinsipalverdiar, men dette vil diskutert vidare i kapittel 4.4.2. Sidan isotropverdiane til kopling $3\pm$ og $4\pm$ er nesten like store og sidan retningane til dei intermediære prinsipalverdiane til koplingane berre avviker med om lag 10° , kunne koplingane tenkast å vere knytte til eit sp^2 -hybridisert $\cdot\text{CH}_2$ -radikalfragment. Men retningane til dei numerisk minste prinsipalverdiane til koplingane har eit avvik på over 142° og ein har difor gått bort frå denne hypotesen. Kopling $5+$ har prinsipalverdiar på forma til ei regulær α -kopling medan kopling $6+$ har prinsipalverdiar på forma til ei regulær β -kopling.

Som for radikal I er eigenvektorane til tensorane samanlikna med krystallografiske retningar for å prøve å lokalisere kvar i molekylet det er sannsynleg at dei ulike vekselverknadane finn stad. Eit framtrekande trekk i tabell 4.3 er at retningane til dei intermediære prinsipalverdiane til kopling $3\pm$, $4\pm$ og $5+$ er relativt like. Vidare ser det ut til at desse intermediære retningane er nær retningsnormalen til den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin, oppgjeven i tabell 4.1. Dette kan tyde på at koplingane $3\pm$, $4\pm$ og $5+$ er lokaliserte i eller nær den aromatiske ringen. Dersom kopling 3-5 er normale α -koplingar vil retningane til dei numerisk minste prinsipalverdiane ligge nær retningar til $\text{C}_\alpha\text{-H}_\alpha$ -bindingar, som skildra i kapittel 2.2.2. På grunn av symmetrien i den aromatiske ringen er retninga til C5-H5 parallell med C8-H8-retninga (sjå figur 3.1 b)) og det viser seg at kopling $3\pm$ har t_{\min}^α nær begge desse krystallografiske retningane. Ei tilsvarande slutning kan trekkjast mellom t_{\min}^α til kopling $4\pm$ og dei parallelle krystallografiske retningane C6-H6 og C9-H9. Retninga til den numerisk minste prinsipalverdien til kopling $5+$ har også eit relativt godt samsvar med C6-H6/C9-H9-retningane, men har likevel eit noko betre samsvar med C3-H(3-2)-retninga i eit uskadd N-acetyl-L-tyrosin-molekyl. For ei β -kopling vil, under rette føresetnader, eigenverdien til den største prinsipalverdien (t_{\max}^β) ligge i same retning som $\text{C}_\alpha\text{-H}_\beta$, sjå kapittel 2.2.2. t_{\max}^β til kopling $6+$ ser ikkje ut til å samsvare spesielt godt med nokon av dei moglege $\text{C}_\alpha\text{-H}_\beta$ -retningane i eit uskadd N-acetyl-L-tyrosin-molekyl.

Ved hjelp av McConnell sin relasjon i likning 2.29 og med ein Q_{CH} -verdi på -72,8 MHz, har spinntettleiken som gjev opphav til kopling 5+, vorte estimert til 0,64. Spinntettleiken berekna frå det største anisotrope bidraget (Gordy si likning 2.31) gjev med $Q_Z^{dip} = 38,7$ MHz ein spinntettleik på 0,57 for same koplinga. Likeeins kan ein finne spinntettleiken frå det isotrope og det største anisotrope bidraget til kopling $3 \pm$. Med bruk av same konstantar som over gjev McConnell si likning ein spinntettleik på 0,19 medan Gordy si likning bereknar spinntettleiken til 0,16. For kopling $4 \pm$ gjev McConnell si likning ein spinntettleik på 0,17 medan Gordy si likning gjev ein spinntettleik på 0,15. Spinntettleikane estimert frå dei anisotrope verdiane i tabell 4.3 er alle noko mindre enn spinntettleikane estimert frå dei isotrope verdiane. Avviket er størst for kopling 5+ noko som kan tyde på ein litt bendt bindingsstruktur for denne koplinga.

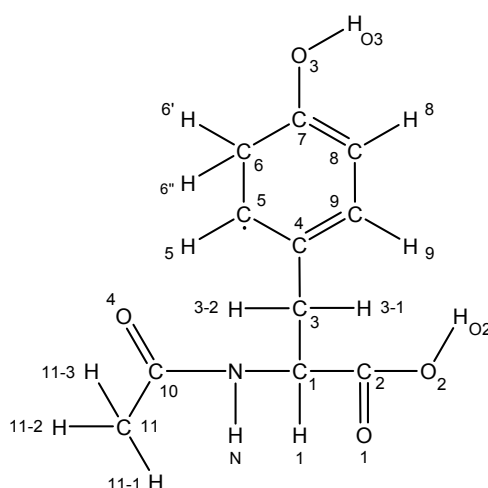
Etter samanlikning av krystallografiske data og eksperimentelle eigenvektorar har fleire ulike modellar for radikalet II vorte undersøkt og i dei neste kapitla følgjer ein gjennomgang av desse.

4.4.2 Kandidat til radikal II: H-addisjonsradikal

På bakgrunn av at eigenvektorane til kopling 3-5 ser ut til å samsvare med ulike C_α - H_α -retningar i den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin, er det naturleg å gå ut frå ein modell der hovuddelen av det upara spinnnet er lokalisert i den aromatiske ringen. Kopling 3 kan i utgangspunktet knytast til H5/H8, kopling 4 til H6/H9 og kopling 5 til H9/H6. Men ei så stor β -kopling som kopling 6+ er i ein slik radikalmødel avhengig av eit proton som ikkje ligg i planet utspent av den aromatiske ringen. Sidan H(O3) og H(3-2) høvesvis er $17,5^\circ$ og $3,8^\circ$ frå å ligge i planet utspent av ringen, kan desse truleg eliminerast som kandidatar til kopling 6+. H(3-1) stikk ut av planet til den aromatiske ringen, men t_{maks}^β til kopling 6+ har eit avvik på $48,7^\circ$ i forhold til C4-H(3-1)-retninga og kopling 6+ kan difor truleg ikkje knytast til dette protonet heller. Frå litteraturen er det i ulike aromatiske system rapportert reduksjonsprodukt danna ved netto hydrogenaddisjonar til dei aromatiske ringane. Ein H-addisjon til den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin vil kunne gje eit proton som er lokalisert ut av planet utspent av den aromatiske ringen og som kan tenkast å vere knytt til kopling 6+.

Med ein eksperimentell spinntettleik på 0,64 (frå McConnell si likning 2.29) er kopling 5+ truleg knytt til karbonatomet med størst spinntettleik i radikal II. Av retningane til koplinga er det sannsynleg at dette karbonatomet anten er C6, C9 eller C3. Det sistnemnde alternativet kjem vi attende til i kapittel 4.4.4. Frå litteraturen har ein fleire dømer på at ein netto hydrogenaddisjon til ein fenyling vil indusere størst spinntettleik på det karbonatomet som er

motstående til hydrogenaddisjonen (sjå figur 4.14). Dersom størsteparten av spinntettleiken er lokalisert til C6/C9 kan ein difor gå ut frå at hydrogenaddisjonen skjer på C9/C6 respektivt. Ein netto hydrogenaddisjon til C9 vil forvente å gje spinntettleik på C4 som igjen gjev grunnlag for ei relativt stor β -kopling til H(3-1) sidan dette protonet stikk ut av planet utspent av den aromatiske ringen. Seinare analyser vil vise at radikal II ikkje har rom for β -koplingar både til H(3-1) og dei to metylenprotona på addisjonsposisjonen, så dersom radikal II er eit H-addisjonsradikal må addisjonen skje på C6, som skissert i figur 4.13.



Figur 4.13: Radikalstruktur for eit reduksjonsprodukt der det har skjedd ein netto hydrogenaddisjon på C6-posisjon i eit N-acetyl-L-tyrosin-molekyl. Radikalet er ein potensiell modell til radikal II observert i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur.

Ved ein hydrogenaddisjon til C6 vil det forventast positiv spinntettleik på C5, C7 og C9 i tillegg til ein viss negativ spinntettleik på C4 og C8. Med kopling $5+$ knytt til H9, kopling $3 \pm$ knytt til H5 og β -koplinga $6+$ knytt til eit av metylenprotona H6'/H6'', kan tabell 4.4 setjast opp. Etter denne modellen må kopling $4 \pm$ vere ei allylliknande kopling til H8. Det vil seie at isotropverdiane til koplinga må setjast som positive og at retninga til den intermediære prinspalverdien bør vere nær retninga til C8-H8-bindinga, medan retninga til den numerisk minste prinspalverdien bør vere nær retninga til $2p_z$ -orbitalen på C8. I tabell 4.4 er dei lågfrekvente greinene til koplingane 3 og 4 uteletne, sidan dei i hovudsak er identiske til dei viste høgfrekvente greinene; $3+$ og $4+$.

Liknande H-addisjonsradikal som det i figur 4.13, er føreslått danna i L-tyrosin og poly-L-tyrosin pulverprøver bombarderte med H-atom og bestrålte med γ -stråling (Liming og Gordy, 1968). I sine studiar av N-acetyl-L-tyrosin har Mezetti *et al.* (1999) føreslått at koplingane som er viste i tabell 4.4, i tillegg til ei β -kopling med isotropverdi på 47,4 MHz, er knytte til H-addisjonsradikalet i figur 4.13.

Tabell 4.4: Hyperfinkoplingstensorane til kopling 3-6 knytt til radikal II ved romtemperatur. Eigenvektorane til tensorane er samanlikna med forventa retningar for hydrogenaddisjonsradikalet i figur 4.13. Tala i parentes representerer standardavviket til det siste talet i den lista verdien.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar			$\Delta\psi^a$ (grader)
				<a>		<c*>	
3+	-14,15 (1)	6,34 (2)	-7,81 (2)	0,933 (1)	0,359 (4)	0,021 (1)	8,2/2
		-1,20 (2)	-15,35 (2)	-0,348 (3)	0,915 (1)	-0,207 (1)	3,9/1
		-5,14 (2)	-19,29 (2)	0,094 (2)	-0,186 (1)	-0,978 (1)	
4+	12,57 (1)	3,77 (2)	16,34 (2)	-0,599 (2)	-0,195 (4)	0,776 (1)	
		1,70 (2)	14,27 (2)	-0,342 (6)	0,939 (1)	-0,028 (2)	94,3/3
		-5,48 (2)	7,09 (2)	-0,724 (1)	-0,282 (5)	-0,630 (1)	80,8/1
5+	-46,44 (1)	22,09 (3)	-24,35 (3)	-0,606 (0)	-0,210 (1)	-0,767 (0)	15,5/4
		-3,67 (2)	-42,77 (2)	-0,233 (1)	0,969 (0)	-0,081 (1)	12,4/1
		-25,76 (3)	-72,21 (3)	0,760 (0)	0,130 (1)	-0,637 (1)	
6+	79,24 (1)	5,58 (2)	84,82 (2)	0,981 (0)	0,193 (17)	-0,023 (9)	
		-2,72 (3)	76,52 (3)	0,092 (1)	-0,358 (91)	0,929 (36)	
		-2,86 (2)	76,38 (2)	0,171 (1)	-0,913 (37)	-0,369 (92)	
Molekylære referansevektorar ^b :							
1. Perpendikulært til den aromatiske ringen				-0,408	0,894	-0,184	
2. Bindingsretninga C5-H5				0,918	0,378	-0,120	
3. Bindingsretninga C8-H8				-0,901	-0,404	0,161	
4. Bindingsretninga C9-H9				-0,479	-0,448	-0,755	

^a Dette er vinkelavviket mellom eigenvektoren og ein av dei molekylære referansevektoranane. Talet til høgre (1/2/3/4) markerer kva for ein av referansevektoranane avviket gjeld for.

^b Referansevektoranane er berekna frå krystallstrukturen, sjå appendiks A.

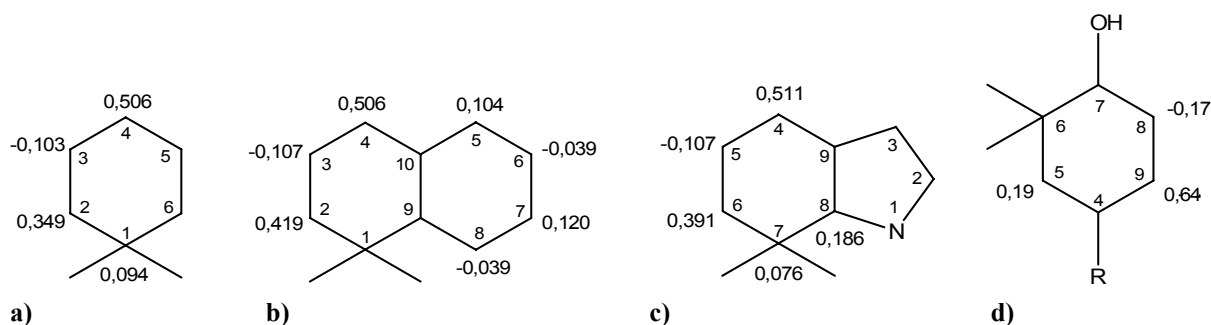
Frå tabell 4.4 ser vektorane t_{\min}^{α} og t_{int}^{α} til kopling $3 \pm$ ut til å ha eit godt samsvar med høvesvis C5-H5-retninga og ringnormalen med vinkelavvik på $8,2^{\circ}$ og $3,9^{\circ}$. Avviket mellom dei forventa retningane til kopling $4 \pm$ og dei eksperimentelle vektorane er derimot uforholdsviss stort. I H-addisjonsradikalet skissert i figur 4.13, vil spinntettleikane på C7 og C9 sannsynlegvis ikkje vere like store. Det viser seg at ujamne fordelingar av spinn på nabokarbonatoma til C_{α} (i dette tilfellet C8) vil kunne polarisere elektronane i σ -bindingane i karbonskjelettet, i tillegg til å kunne indusere ulike dipolare vekselverknadar til H_{α} . Resultatet er ofte ei forskyving av retninga til den intermediære prinspalverdien til den allylliknande koplinga, samanlikna med retninga til C_{α} - H_{α} -bindinga (Böhme og Wolf, 1972). Eit avvik på rundt 90° , som funne for kopling $4 \pm$, er likevel urimeleg og høgst ufysikalsk. Eigenvektoren til den minste prinspalverdien burde i alle høve ikkje verte påverka av slike effektar sidan ringnormalen er felles symmetriretning for alle koplingane. Tabell 4.4 viser likevel at vektoren har eit stort avvik på rundt 80° frå den forventa retninga langs ringnormalen. Kopling 5+ har t_{\min}^{α} og t_{int}^{α} som samsvarer relativt godt med høvesvis C9-H9-retninga (avvik $15,5^{\circ}$) og ringnormalen (avvik $12,4^{\circ}$).

I avsnitt 4.4.1 vart spinntettleiken på det sentrale karbonatomet for kopling $3 \pm$ berekna til 0,19 (frå McConnell si likning 2.29). Ved å gå ut frå at kopling $3 \pm$ er knytt til H5 og at spinntettleikane på C5 og C7 er tilnærma like, kan ein berekne dihedravinkelen til β -koplinga 6+ tenkt knytt til H6'. Spinntettleiken på C6 kan bereknast som ein effektiv spinntettleik ρ_{eff}^{π} , samansett av spinntettleikane på C5 og C7 (Whiffen, 1963):

$$\rho_{eff}^{\pi} = (\sqrt{\rho(C5)} + \sqrt{\rho(C7)})^2$$

Når $\rho(C5) \approx \rho(C7) \approx 0,19$ vert $\rho_{eff}^{\pi} \approx 0,76$. Med denne effektive spinntettleiken og med $B_0 \approx 0$ og $B_2 \approx 112$ MHz (Fessenden og Schuler, 1963b) sett inn i likning 2.33, vert dihedravinkelen knytt til kopling 6+ om lag 15° . Vinkelen $\angle H6'-C6-H6''$ er truleg rundt 120° og det medfører at det andre protonet bunde til C6 (H6'') må ha ein dihedravinkel på om lag 45° i forhold til ringnormalen. Med same konstantar og spinntettleik som over, vil ein dihedravinkel på 45° gje ein isotropverdi på 42,6 MHz som tilsvarer 15,2 mT (frå likning 2.33). Denne koplinga er mykje større enn dei 0,8 mT som det er rom for i EIE-spektra til radikal II og med andre ord kan ikkje både kopling 6+ (H6') og den teoretisk berekna koplinga til det andre metylenprotonet (H6'') vere knytte til radikal II.

H-addisjonsradikal danna i system med aromatiske ringar er, som tidlegare nemnt, velkjente frå litteraturen. Figur 4.14 a) viser eksperimentelle spinntettleikar i radikalet syklohexadienyl (Fessenden og Schuler, 1963a), 4.14 b) viser eksperimentelle spinntettleikar i eit α -hydronaftyldradikal (Böhme og Wolf, 1972), 4.14 c) viser eksperimentelle spinntettleikar for eit H-addisjonsradikal i tryptamin (Theisen og Sagstuen, 1981) og 4.14 d) viser spinntettleikar for det potensielle H-addisjonsradikalet i N-acetyl-L-tyrosin berekna frå tensorane i tabell 4.4. Radikala i figur 4.14 a)-c) har store likskapstrekk med tanke på spinnfordeling. Karbonatomet lokalisert rett overfor H-addisjonen har størst spinntettleik med verdiar rundt 0,51. Det eine av nabokarbonatoma til H-addisjonen har spinntettleik mellom 0,35-0,42, medan den negative spinntettleiken for dei allylliknande koplingane er rundt -0,10. Spinntettleikane i figur 4.14 d) viser få likskapstrekk med dette mønsteret. Spinntettleiken på C9 er mykje større og spinntettleiken på C5 er mykje mindre i figur 4.14 d) samanlikna med spinntettleikane på dei tilsvarande posisjonane i radikala i figur 4.14 a)-c). Heller ikkje den negative spinntettleiken på C8 i figur 4.14 d) har mykje til felles med dei tilsvarande negative spinntettleikane i radikala 4.14 a)-c).



Figur 4.14: Eksperimentelle spinntetleiksfordelingar ved H-addisjon til ulike aromatiske system.

a) Syklohexadienyl-radikal (Fessenden og Schuler, 1963a), b) α -hydronafty-radikal (Böhme og Wolf, 1972), c) H-addisjonsradikal i tryptamin (Theisen og Sagstuen, 1981) og d) potensielt H-addisjonsradikal i N-acetyl-L-tyrosin. R markerer sidegruppa til den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin, sjå t.d. figur 3.1 b).

Analysen og drøftinga i dette kapitlet viser at radikalkandidaten i figur 4.13 ikkje gjev eit tilfredstillande samsvar med radikal II ved romtemperatur og allereie på dette tidspunktet ser kandidaten ut til å kunne forkastast. Retningane til kopling $4 \pm$ svarer ikkje til retningane forventa for ei allyltype kopling knytt til H8, spinnfordelinga for radikal II er ikkje i samsvar med den forventa spinnfordelinga i H-addisjonsradikalet og i tillegg har EIE-spekteret til radikal II ikkje rom for både den eksperimentelle β -koplinga 6+ (tiltenkt H6') og den berekna β -koplinga til H6''. Vi har likevel valt å estimere teoretiske hyperfinkoplingar for H-addisjonsradikalet ved hjelp av DFT for å sjå om dei DFT-berekna koplingane følgjer mønsteret rapportert frå liknande system i litteraturen, eller om dei berekna koplingane er meir i samsvar med dei eksperimentelle koplingane. Resultata av DFT-berekningane er viste i kapittel 4.4.3.

4.4.3 DFT-berekningar av H-addisjonsradikal

Som kjent gjev DFT-berekningar teoretiske hyperfinkoplingsmatriser som kan samanliknast med eksperimentelle hyperfinkoplingar. Som for radikal I er den opphavslege molekylstrukturen frå krystallografiske data nytta som utgangspunkt for DFT-berekningane. Det vart konstruert ulike H-addisjonsradikal ved å addere proton til ulike posisjonar i den aromatiske ringen. Dette vart gjort for å teste om posisjonen til den netto H-addisjonen hadde innverknad på storleiken til dei DFT-berekna koplingane. Sidan ein forventar at størsteparten av spinnet vil vere lokalisert i den aromatiske ringen i slike H-addisjonsradikal, har C1 (saman med resten av molekylet) vorte erstatta av eit enkelt H-atom på C3. Dette vil lette DFT-berekningane og vil truleg ha liten innverknad på dei berekna tensorane tilknytte den aromatiske ringen.

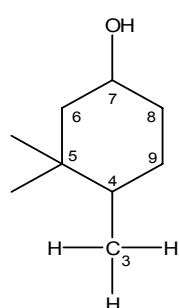
Tabell 4.5 viser resultatet fra DFT-berekingar for H-addisjon til høvesvis a) C5, b) C6, c) C8 og d) C9. Tabellen viser det same mønsteret for alle radikala, sjølv om H-addisjonen skjer på ulike posisjonar i den aromatiske ringen. Den største α -koplinga er i alle tilfella koplinga rett overfor hydrogenaddisjonen, med ein isotropverdi som varierar mellom -33 MHz og -35 MHz. Dette vil gje spinntettleikar mellom 0,45-0,48 (likning 2.29) og desse verdiane samsvarer bra med dei eksperimentelle resultata funne frå litteraturen, sjå figur 4.14 a)- c). Samsvaret med den eksperimentelle spinntettleiken på 0,64 for kopling 5+ er derimot dårleg. Med utgangspunkt i isotropverdien til H6, H5, H9 og H8 i høvesvis tabell 4.5 a)-d) kan spinntettleiken til det eine av karbonatoma på naboposisjon til H-addisjonen estimerast til å vere om lag 0,32. Denne verdien er i samsvar med dei tilsvarande resultata frå litteraturen, men ikkje i samsvar med spinntettleiken på 0,19 berekna frå kopling $3 \pm$. Dei allylliknande koplingane i tabell 4.5 a)-d) følgjer mønsteret for allylkoplingar og isotropverdiane gjev spinntettleiker mellom -0,10 og -0,12. Igjen er desse spinntettleikane i samsvar med dei eksperimentelle resultata frå litteraturen, men ikkje med spinntettleiken på -0,17 for kopling $4 \pm$.

Etter optimaliseringa i DFT-berekingane, vart det adderte og det opphavelge protonet på addisjonsposisjonen ekvivalent bundne med dihedralkvinklar på om lag 30° i forhold til ringnormalen. Med spinntettleikar på rundt 0,32 på nabokarbonatoma til H-addisjonen og med den effektive spinntettleiken frå likninga til Whiffen (1963), vert β -koplingane til dei to metylenprotona store. Dette reflekterast i tabell 4.5 a)- d) der dei DFT-berekna isotropverdiane til metylenprotona er mellom 120 og 130 MHz.

Oppsummert ser dei DFT-berekna tensorane til H-addisjonsradikala i N-acetyl-L-tyrosin ut til å følgje same mønster som tensorane til ulike H-addisjonsradikal frå litteraturen. Posisjonen til addisjonen ser ikkje ut til å ha stor innverknad på storleiken til koplingane. Ingen av dei DFT-berekna H-addisjonsradikala i tabell 4.5 gjev tensorar som svarer til tensorane knytt til radikal II og DFT-berekingane støttar slik opp under konklusjonen i kapittel 4.4.2 der H-addisjonsradikalet vart gått bort frå som kandidat til radikal II.

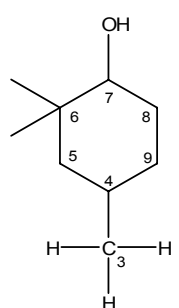
Tabell 4.5 a) - d): DFT-berekna hyperfinkoplingstensorar for radikal danna ved netto hydrogenaddisjonar til den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin; a) H-addisjon til C5, b) H-addisjon til C6, c) H-addisjon til C8 og d) H-addisjon til C9. Radikalstrukturane er fullstendig optimalisert.

a) H-addisjon til C5.



Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H6 (DFT)	-23,21	15,19	-8,02	0,498	0,375	0,782
		-0,45	-23,66	-0,386	0,903	-0,187
		-14,74	-37,95	0,777	0,209	-0,594
H8 (DFT)	-34,40	20,77	-13,63	0,919	0,359	-0,161
		0,85	-33,55	-0,386	0,904	-0,187
		-21,62	-56,02	0,078	0,234	0,969
H9 (DFT)	8,90	4,94	13,84	0,739	0,182	-0,649
		-0,87	8,03	0,553	0,389	0,737
		-4,07	4,83	0,386	0,903	-0,187
H5' (DFT)	125,73	3,79	129,52	0,647	0,742	-0,176
		0,02	125,75	0,037	0,200	0,979
		-3,82	121,91	0,761	-0,640	0,102
H5'' (DFT)	126,25	3,80	130,05	0,997	-0,080	-0,006
		0,02	126,27	0,024	0,229	0,973
		-3,82	122,43	0,077	0,970	-0,230

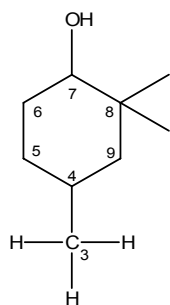
b) H-addisjon til C6.



Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H5 (DFT)	-23,23	14,80	-8,43	0,946	0,282	-0,158
		-0,49	-23,72	-0,308	0,934	-0,180
		-14,32	-37,55	0,097	0,219	0,971
H8 (DFT)	7,83	4,31	12,14	0,176	0,243	0,954
		-0,24	7,59	0,935	0,263	-0,239
		-4,08	3,75	-0,309	0,934	-0,180
H9 (DFT)	-34,33	20,56	-13,77	0,553	0,330	0,765
		1,04	-33,29	-0,308	0,934	-0,180
		-21,60	-55,93	0,774	0,136	-0,618
H6' (DFT)	119,00	3,25	122,25	0,691	-0,075	0,719
		0,22	119,22	0,722	0,127	-0,680
		-3,47	115,53	-0,040	0,989	0,142
H6'' (DFT)	118,38	3,26	121,64	0,438	0,694	0,572
		0,22	118,60	0,734	0,092	-0,673
		-3,48	114,90	-0,520	0,714	-0,468

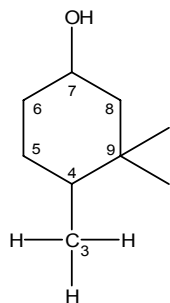
4 Resultat og analyse av romtemperaturdata

c) H-addisjon til C8.



Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinspalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H5 (DFT)	-34,99	20,89	-14,10	0,946	0,313	-0,085
		1,15	-33,84	-0,323	0,928	-0,184
		-22,04	-57,03	0,021	0,202	0,979
H6 (DFT)	7,29	4,02	11,31	0,811	0,171	-0,560
		0,03	7,32	0,488	0,331	0,808
		-4,05	3,24	-0,323	0,928	-0,184
H9 (DFT)	-23,99	15,27	-31,94	0,490	0,330	0,807
		-0,47	-47,68	-0,323	0,928	-0,184
		-14,80	-62,01	0,809	0,170	-0,562
H8' (DFT)	120,04	3,55	123,59	0,711	0,687	-0,150
		0,08	120,12	0,004	0,209	0,978
		-3,63	116,41	0,704	-0,700	-0,149
H8'' (DFT)	120,09	3,55	123,64	0,992	-0,122	0,012
		0,08	120,17	0,011	0,185	0,983
		-3,63	116,46	0,122	0,975	-0,185

d) H-addisjon til C9.



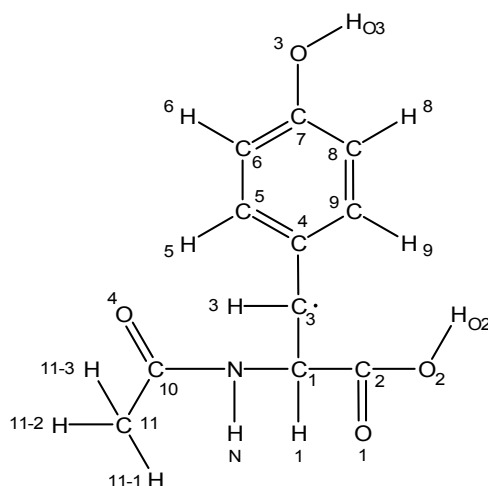
Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinspalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H5 (DFT)	8,59	4,72	13,31	-0,005	0,204	0,979
		-0,79	7,80	0,890	0,448	-0,088
		-3,93	4,66	-0,456	0,871	-0,184
H6 (DFT)	-33,02	19,98	-13,04	0,495	0,419	0,761
		1,18	-31,84	0,454	0,871	-0,183
		-21,16	-54,18	0,740	0,256	-0,623
H8 (DFT)	-25,98	16,89	-9,09	0,886	0,424	0,188
		-0,58	-26,56	-0,456	0,871	-0,184
		-16,32	-42,30	0,086	0,249	0,965
H9' (DFT)	130,86	3,94	134,80	0,170	0,751	0,639
		-0,01	130,85	0,750	0,322	-0,558
		-3,93	126,93	0,639	-0,577	0,509
H9'' (DFT)	130,71	3,95	134,66	0,588	-0,048	0,808
		-0,01	130,70	0,791	0,245	-0,561
		-3,93	126,78	-0,171	0,968	0,182

4.4.4 Kandidat til radikal II: C3-oksidasjonsradikal

Sidan retningane til dei intermediære prinspalverdiane til kopling 3, 4 og 5 samsvarer med retninga perpendikulært på den aromatiske ringen, er det vanskeleg å tenke seg at koplingane i tabell 4.3 ikkje er lokaliserte i eller nær den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin.

Analysen i kapittel 4.4.2 og 4.4.3 viser at kopling 4 ikkje passar inn i mønsteret til ei allylliknande kopling og vidare i analysen går vi ut frå at denne, i likskap med kopling 3 og 5, er ei α -kopling.

Ein annan kandidat til radikal II er oksidasjonsradikalet i figur 4.15, der eit av molekyla H(3-1)/H(3-2) har vorte abstrahert frå N-acetyl-L-tyrosin som følgje av bestråling. Ein abstraksjon av H(3-1)/H(3-2) vil indusere ein relativt stor spinntettleik i $2p_z$ -orbitalen på C3 som vil gje ei sterk α -kopling til det attverande protonet, her kalla H3. Dersom C3-H3-bindinga ligg om lag i planet utspent av den aromatiske ringen, vil ein god del av det upara spinnet kunne verte delokalisert over i den aromatiske ringen. Dette vil sannsynlegvis medføre positiv spinntettleik på C5 og C9 som dermed kan gje α -koplingar til H5 og H9. C7 vil truleg og få ein viss positiv spinntettleik i eit slikt radikal og denne spinntettleiken vil kunne gje ei β -kopling til H(O3). Sidan H(O3) har ein dihedralvinkel på nær 73° i forhold til ringnormalen i ein uskadd molekyllstruktur, vil likevel koplinga til dette protonet truleg verte lita og dermed ikkje vere ein kandidat til den eksperimentelt observerte β -koplinga 6+.



Figur 4.15: Radikalstruktur for eit oksidasjonsprodukt i N-acetyl-L-tyrosin, der H(3-1) bunde til C3 har gått tapt til omgjevnadane. Radikalet er ein potensiell kandidat til radikal II observert i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur.

I tillegg til α -koplinga til H3 vil ein spinntettleik på C3 kunne gje grunnlag for ei β -kopling til H1. Storleiken til denne β -koplinga vil vere bestemt av dihedralvinkelen til H1 i forhold til

$2p_z$ -orbitalen på C3. I ein uskadd molekyllstruktur er denne nær 90° . Med den uskadde krystallstrukturen som utgangspunkt har med andre ord radikalmodellen i figur 4.15 ikkje ein god kandidat til kopling 6+. Dersom det skjer strukturelle endringar i N-acetyl-L-tyrosin-molekylet etter bestråling, slik at H1 får ein redusert dihedralkvinkel i forhold til $2p_z$ -orbitalet på C3 kan likevel kopling 6+ vere knytt til dette protonet. I tabell 4.6 er kopling 5+ tenkt knytt til H3, 3+ tenkt knytt til H5, 4+ tenkt knytt til H9 og kopling 6+ tenkt knytt til H1. Dei lågfrekvente variantane av kopling 3 og 4 er ikkje tekne med i tabellen sidan dei i hovudsak er identiske til dei høgfrekvente variantane lista i tabellen.

Tabell 4.6: Hyperfinkoplingstensorane for kopling 3-6 knytt til radikal II ved romtemperatur. Eigenvektorane til tensorane er samanlikna med forventa retningar for C3-oksidasjonsradikalet i figur 4.15. Tala i parentes representerer standardavviket til det siste talet i den lista verdien.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar			$\Delta\psi^a$ (grader)
				<a>		<c*>	
3+	-14,15 (1)	6,34 (2)	-7,81 (2)	0,933 (1)	0,359 (4)	0,021 (1)	8,2/2
		-1,20 (2)	-15,35 (2)	-0,348 (3)	0,915 (1)	-0,207 (1)	3,9/1
		-5,14 (2)	-19,29 (2)	0,094 (2)	-0,186 (1)	-0,978 (1)	
4+	-12,57 (1)	5,48 (2)	-7,09 (2)	-0,724 (1)	-0,282 (5)	-0,630 (1)	18,5/3
		-1,70 (2)	-14,27 (2)	-0,342 (6)	0,939 (1)	-0,028 (2)	10,1/1
		-3,77 (2)	-16,34 (2)	-0,599 (2)	-0,195 (4)	0,776 (1)	
5+	-46,44 (1)	22,09 (3)	-24,35 (3)	-0,606 (0)	-0,210 (1)	-0,767 (0)	13,0/4
		-3,67 (2)	-42,77 (2)	-0,233 (1)	0,969 (0)	-0,081 (1)	12,4/1
		-25,76 (3)	-72,21 (3)	0,760 (0)	0,130 (1)	-0,637 (1)	
6+	79,24 (1)	5,58 (2)	84,82 (2)	0,981 (0)	0,193 (17)	-0,023 (9)	50,2/5
		-2,72 (3)	76,52 (3)	0,092 (1)	-0,358 (91)	0,929 (36)	
		-2,86 (2)	76,38 (2)	0,171 (1)	-0,913 (37)	-0,369 (92)	
Molekylære referansevektorar ^b :							
1. Perpendikulært til den aromatiske ringen				-0,408	0,894	-0,184	
2. Bindingsretninga C5-H5				0,918	0,378	-0,120	
3. Bindingsretninga C9-H9				-0,479	-0,448	-0,755	
4. Bindingsretninga C3-H(3-2)				-0,615	-0,415	-0,670	
5. Bindingsretninga C3-H1				0,482	0,875	0,054	

^a Dette er vinkelavviket mellom eigenvektoren og ein av dei molekylære referansevektoranane. Talet til høgre (1/2/3/4/5) markerer kva for ein av referansevektoranane avviket gjeld for.

^b Referansevektoranane er kalkulert frå krystallstrukturen, sjå appendiks A.

Tabell 4.6 viser at avviket mellom retningane til dei intermediære prinspalverdiane til kopling 3+, 4+ og 5+ og retninga perpendikulært på den aromatiske ringen er under 13° . Avviket mellom t_{\min}^α til kopling 3+ og retninga til bindinga C5-H5 er $8,2^\circ$. Vektoren t_{\min}^α til kopling 4+ og retninga til C9-H9-bindinga samsvarer ikkje fullt så godt med eit vinkelavvik på $18,5^\circ$. Kopling 5+ ser ut til å ha ei t_{\min}^α -retning som ligg nær retninga til C3-H(3-2) i den opphavelige molekyllstrukturen (avvik 13°). Dette kan indikere at det attverande protonet

etter ein oksidasjon på C3, vil ha om lag same posisjon i radikalet som H(3-2)-atomet har i eit uskadd molekyl. Ei samanlikning av retninga t_{maks}^{β} til kopling 6+ og retninga C3-H1 frå krystallografiske data gjev som forventa eit stort avvik på rundt 50°.

Ser ein bort frå kopling 6+ synast radikalmodellen i figur 4.15 å kunne gjere greie for koplingane knytte til radikal II ved romtemperatur. Men det er eit problem at begge dei to moglege kandidatane til kopling 6+; H(O3) og H1, er lokalisert på ein slik måte at dei potensielle koplingane til desse protona etter alt sannsyn vert små. Det er sjølvstøtt mogleg at det som følgje av rehybridiseringar eller coulombske vekselverknadar, skjer endringar i radikalstrukturen som fører til endringar i hyperfinkoplingar. Det må likevel store strukturmessige endringar til for at protonet H1 skal kunne knytast til kopling 6+. Sidan både den aromatiske ringen, karboksylgruppa og acetylgruppa er stabiliserte ved hydrogenbindingar i krystallstrukturen synast slike endringar usannsynlege. Men modellen har trass alt har eit betre samsvar med radikal II enn H-addisjonsradikalet i kapittel 4.4.2-4.4.3. Det neste kapitlet viser resultata av DFT-berekningar på C3-oksidasjonsradikalet i figur 4.13.

4.4.5 DFT-berekningar av C3-oksidasjonsradikal

For å få estimert optimalisert struktur og hyperfinkoplingstensorar for oksidasjonsradikalet skissert i figur 4.13, vart det føreteke DFT-berekningar. H(3-1) vart fjerna frå den opphavlege molekylstrukturen og atoma C1, C3, H1, H3, H5, H6, H8 og H9 fekk optimalisere fritt. Resten av molekylet vart låst sidan både den aromatiske ringen, karboksylgruppa og acetylgruppa med peptidbinding vil vere stabilisert av hydrogenbindingar til andre molekyl i krystallen. Følgjeleg vil posisjonen til H1 truleg ikkje endre seg nok til å samsvare kopling 6+, men ein kan få berekna koplingar til H3, H5 og H9 som kan samanliknast med dei eksperimentelle koplingane 3-5.

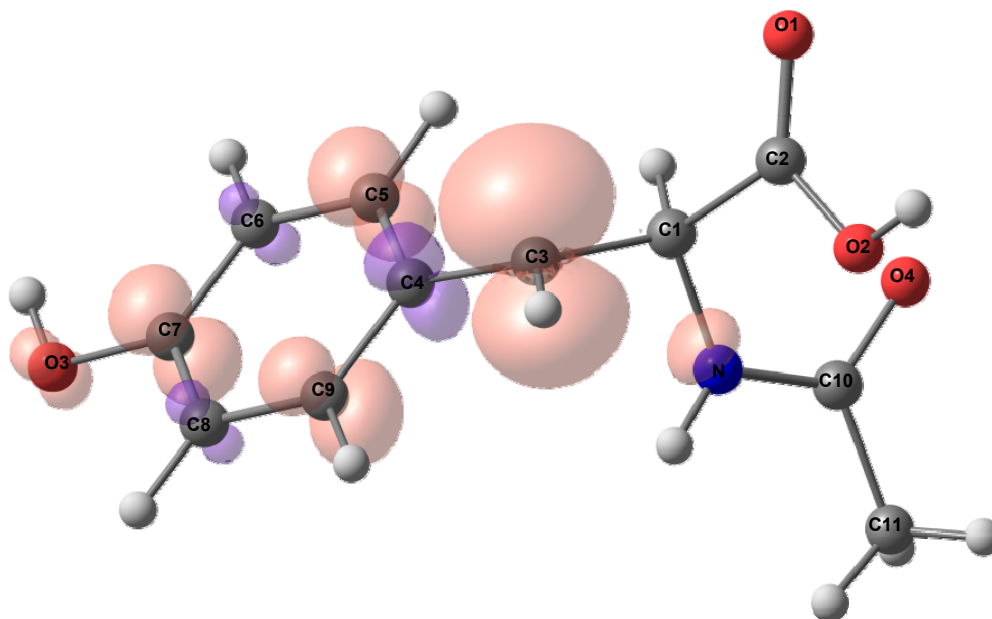
I tabell 4.7 er hyperfinkoplingstensorane frå DFT-berekningane lista og figur 4.16 viser isospinnfordelinga over radikalet. Tensorane i tabell 4.7 viser at ein abstraksjon av H(3-1) som forventa gjev opphav til ei stor α -kopling til H3 og to mindre koplingar til H5 og H9. Det vil til ei viss grad verte induisert negativ spinnettleik på C6 og C8 som gjev opphav til små allylliknande koplingar til H6 og H8, sjå tabell 4.7 og figur 4.16. H1 endrar seg minimalt ved optimalisering og har etter optimalisering ein diedralvinkel på om lag 78° i forhold til 2p_z-orbitalen på C3. β -koplinga til H1 vert dermed for lita til å kunne svare til den eksperimentelle kopling 6+. Av tabell 4.7 ser ein og at H(N) vil oppleve ei kopling av mindre art. β -koplinga

til H(O3) vert frå DFT-berekningane minimal, men er teke med i tabell 4.7 for heilskapen si skuld.

Tabell 4.7: DFT-berekna hyperfinkoplingstensorar for **C3-oksidasjonsradikalet** i figur 4.15. Radikalet er etablert ved å fjerne H(3-1) frå den opphavlege molekylstrukturen til N-acetyl-L-tyrosin. C1, C3, H1, H3, H5, H6, H8 og H9 fekk optimalisere fritt. Resten av molekylet er låst til dei krystallografiske data.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H5 (DFT)	-9,73	5,49	-4,24	0,789	0,575	0,216
		-2,22	-11,95	-0,510	0,418	0,752
		-3,27	-13,00	-0,343	0,704	-0,623
H9 (DFT)	-9,36	6,18	-3,18	0,625	0,634	0,456
		-2,82	-12,18	-0,476	-0,153	0,866
		-3,36	-12,72	-0,619	0,758	-0,207
H3 (DFT)	-43,93	32,20	-11,73	0,432	0,607	0,667
		-0,75	-44,68	0,777	-0,625	0,066
		-31,45	-75,38	-0,458	-0,490	0,742
H1 (DFT)	14,49	8,07	22,56	0,521	0,852	0,053
		-3,66	10,83	0,851	-0,523	0,045
		-4,41	10,08	-0,066	-0,022	0,998
H6 (DFT)	3,95	2,17	6,12	-0,691	-0,122	0,713
		-0,41	3,54	0,625	0,395	0,674
		-1,76	2,19	-0,363	0,911	-0,197
H8 (DFT)	4,61	2,12	6,73	-0,054	0,123	0,991
		-0,31	4,30	0,923	0,384	0,002
		-1,81	2,80	-0,381	0,915	-0,134
H(N) (DFT)	-1,14	8,07	6,93	0,710	-0,577	0,405
		-1,04	-2,18	0,677	0,718	-0,163
		-7,03	-8,17	-0,197	0,389	0,900
H(O3) (DFT)	-0,87	4,53	3,66	0,498	0,234	0,835
		-1,64	-2,51	-0,228	0,964	-0,134
		-2,89	-3,76	0,836	0,124	-0,534

Tabell 4.6 og 4.7 viser eit forholdsvis godt samsvar mellom isotropverdiane til kopling 5+ og H3. Samsvaret mellom dei anisotrope verdiane og eigenvektoraner for dei to koplingane er derimot dårleg. Med $Q_{CH} \approx -72,8$ MHz og $Q_Z^{dip} \approx 38,7$ MHz gjev McConnell og Gordy sine likningar frå kapittel 2.2.2 spinntettleikar på høvesvis 0,60 og 0,85 med kopling H3 i tabell 4.7 som utgangspunkt. Liknande berekningar for den eksperimentelle tensoren 5+ gjev spinntettleikar på 0,64 og 0,57. DFT estimerer med andre ord C4-C3-C1-fragmentet til å vere eit meir bendt fragment enn det dei eksperimentelle resultata tilseier. I tillegg er vinkelen mellom planet utspent av den aromatiske ringen og retninga til C3-H3 rundt 20° i den DFT-optimaliserte radikalstrukturen. Det vil i neste omgang tyde at $2p_z$ -orbitalen på C3 vil avvike med 20° frå retninga perpendikulært på den aromatiske ringen. Dette avviket er større enn det eksperimentelt estimerte avviket på om lag 12° for kopling 5+ i tabell 4.6.



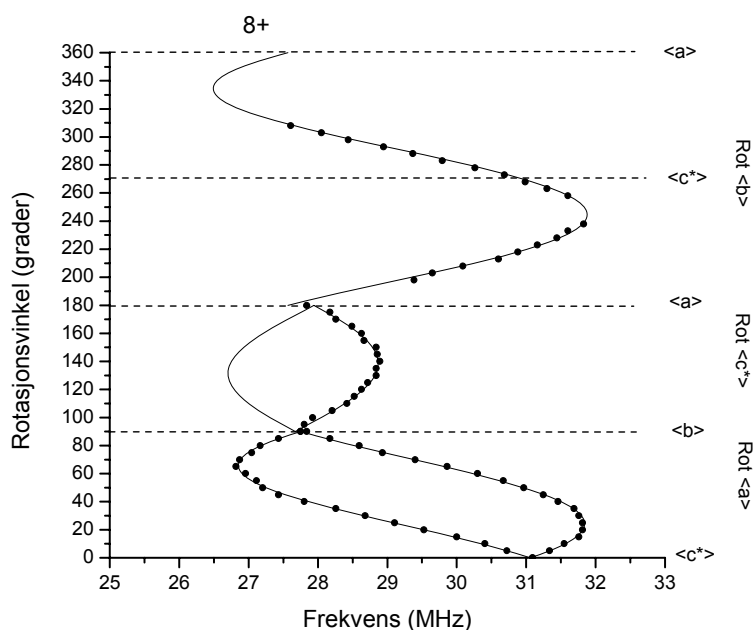
Figur 4.16: Dei raude sfærane viser fordeling av positiv isospinntettleik og dei lilla sfærane viser fordeling av negativ isospinntettleik for C3-oksidasjonsradikalet i figur 4.15 som er ein potensiell modell for radikal II ved romtemperatur. Spinntettleikane er henta ut frå DFT-berekningane. Konturverdien er 0,006490 a. u. for dei viste spinnoverflatene.

Samsvaret mellom dei DFT-berekna tensorane H5 og H9 og dei eksperimentelle tensorane 3 og 4 er heller ikkje godt. H5 og H9 har anisotrope verdiar som er svært aksialsymmetriske for α -koplingar å vere. Det er heller ikkje eit spesielt godt samsvar mellom eigenvektorane til H5 og H9 og eigenvektorane til dei eksperimentelle tensorane 3 og 4.

DFT-berekningane av C3-oksidasjonsradikalet har samla sett ikkje eit godt samsvar med radikal II. Men som tidlegare sagt kan det tenkast å skje strukturelle omorganiseringar som ein ikkje har kontroll over og som gjer modellen meir sannsynleg. C3-oksidasjonsmodellen synast i alle høver å vere ein meir sannsynleg kandidat til radikal II enn H-addisjonsradikalet drøfta i kapitla 4.4.2- 4.4.3. Resultata og analysane av radikal II vert oppsummerte og vidare drøfta i kapittel 6.

4.5 Radikal III

Figur 4.17 viser dei observerte angulære variasjonane i ENDOR-resonansfrekvensen til den høgfrekvente greina av kopling 8 som er knytt til radikal III ved romtemperatur. Den lågfrekvente greina til koplinga har ikkje lete seg observere i våre målingar. Ved hjelp av MAGRES (Nelson og Gill, 1978; Nelson, 1980) vart hyperfinkoplingstensen for kopling 8+ etablert, sjå tabell 4.8. Tabellen viser begge Schonlandvariantane for koplinga. Frå tensoren vart frekvensvariasjonane til ENDOR-linjene berekna og desse er viste som heiltrekte kurver i figur 4.17. Ved rotasjon om $\langle c^* \rangle$ og $\langle b \rangle$ var intensiteten til ENDOR-linjene svak og målingane i desse plana er difor relativt usikre.



Figur 4.17: Observerte endringar i ENDOR resonansfrekvensar for kopling 8+ knytt til radikal III observert i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur og målte ved om lag 240 K. Dei heiltrekte kurvene viser variasjonane i ENDOR-frekvens for kopling 8+ berekna frå tensordata i tabell 4.8.

Tabell 4.8: Hyperfinkoplingstensor for kopling 8+ knytt til **radikal III** observert i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur og nedkjølte til ca. 240 K under målingane. Tala i parentes representerer standardavviket til det siste talet i den lista verdien. Begge Schonlandvariantane (i) og (ii) for kopling 8+ er viste.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar			$\Delta\psi^a$ (grader)
				<a>		<c*>	
8+		8,20 (3)	36,48 (2)	-0,413 (2)	0,376 (29)	0,829 (3)	11,6/1
Variant (i)	28,28 (2)	-3,73 (3)	24,55 (2)	0,106 (1)	0,924 (2)	-0,366 (30)	
		-4,46 (5)	23,82 (4)	0,904 (1)	0,064 (13)	0,422 (11)	
8+		6,95 (3)	35,36 (2)	-0,322 (2)	0,295 (2)	0,899 (2)	6,9/1
Variant (ii)	28,41 (2)	0,10 (4)	28,51 (3)	-0,697 (2)	-0,717 (2)	-0,015 (1)	
		-7,04 (4)	21,37 (3)	-0,640 (1)	0,632 (3)	-0,437 (1)	
Molekylær referansevektor ^b :							
1. Bindingsretninga C2-H1				-0,226	0,366	0,903	

^a Dette er vinkelavviket mellom eigenvektoren og ein molekylær referansevektor. Talet til høgre markerer kva referansevektor avviket gjeld for.

^b Referansevektoren er berekna frå krystallstrukturen, sjå appendiks A.

4.5.1 Analyse av kopling, radikal III

Prinsipalverdiene til Schonlandvariant (i) i tabell 4.8 ser ut til å ha β -karakter. Den andre Schonlandvarianten (ii) ser ut til å ha α -karakter, men tensoren har forholdsvis liten anisotropi. Sidan ei α -kopling i utgangspunktet er kjenneteikna av stor anisotropi, er variant (ii) truleg ikkje ei regulær α -kopling.

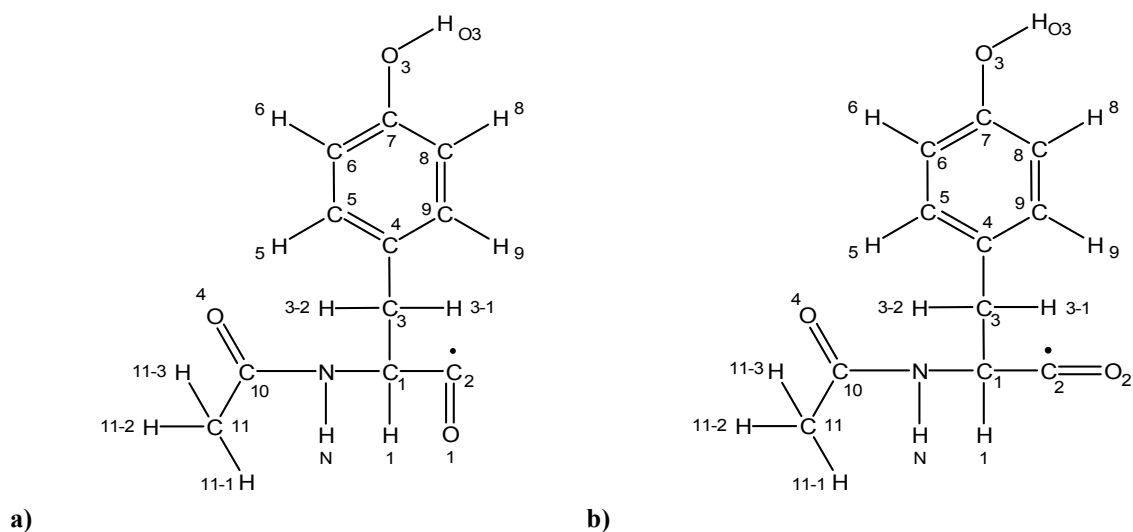
I EPR- og EIE-spektra i kapittel 4.1 og 4.2, gjev radikal III opphav til ein dublett separert med om lag 1,2 mT. På grunn av denne strukturen er det rimeleg å gå ut frå at radikal III i hovudsak berre gjev opphav til ei kopling (kopling 8). Av krystallstrukturen til N-acetyl-L-tyrosin ser ein at det er avgrensa kvar i molekylet ei enkelt β -kopling kan forventast å vere lokalisert. På den andre sida kan det tenkast at N-acetyl-L-tyrosin-molekylet etter bestråling vert splitta opp på ein slik måte at dei krystallografiske retningane frå appendiks A ikkje lenger er representative for radikalet. Er dette tilfelle har ein ikkje lenger moglegheit til å knyte koplingar til bestemte krystallografiske retningar i ein uskadd molekylstruktur.

Eit upara spinn lokalisert i $2p_z$ -orbitalen på C2 vil under rette føresetnadar kunne tenkast å gje ei enkelt β -kopling til H1. For begge Schonlandvariantane er retninga til den største prinsipalverdien samanlikna med retninga til C2-H1 og dette gjev avvik på $11,6^\circ$ og $6,9^\circ$, som vist i tabell 4.8. Vidare vert tre moglege radikalkandidatar, med hovudparten av spinnet lokalisert til C2, analyserte og drøfta.

4.5.2 Kandidat til radikal III: σ -radikal

Figur 4.18 viser to ulike potensielle kandidatar til radikal III danna i N-acetyl-L-tyrosin etter bestråling ved romtemperatur. Begge radikala er tenkt danna ved avspalting av CO_2 , etter ein reduksjon og ei protonering av karboksylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin (sjå figur 6.2). I begge radikala vil det upara spinnet truleg vere lokalisert i same plan som $\text{C2} = \text{O}$ -bindinga i ein sokalla σ -orbital og radikala er difor kalla σ -radikal. Sidan det upara spinnet ikkje er lokalisert i ein "vanleg" $2p_z$ -orbital vil ein ikkje forvente at koplinga til H1 er ei regulær β -kopling, men koplinga kan tenkast å samsvare variant (ii) av kopling 8+.

Liknande σ -radikal som dei i figur 4.18, er funne i einkrystallstudiar av malonsyre og succinsyre (Box, 1977) og er føreslått danna i N-acetyl-L-tyrosin-krystallar etter bestråling ved romtemperatur (Mezetti *et al.*, 1999). Frå litteraturen er det ikkje rapportert hyperfintensorar for slike radikal, så for å få ein peikepinn om storleiken på hyperfinkoplingane forventata for radikala i figur 4.18, er DFT nytta.

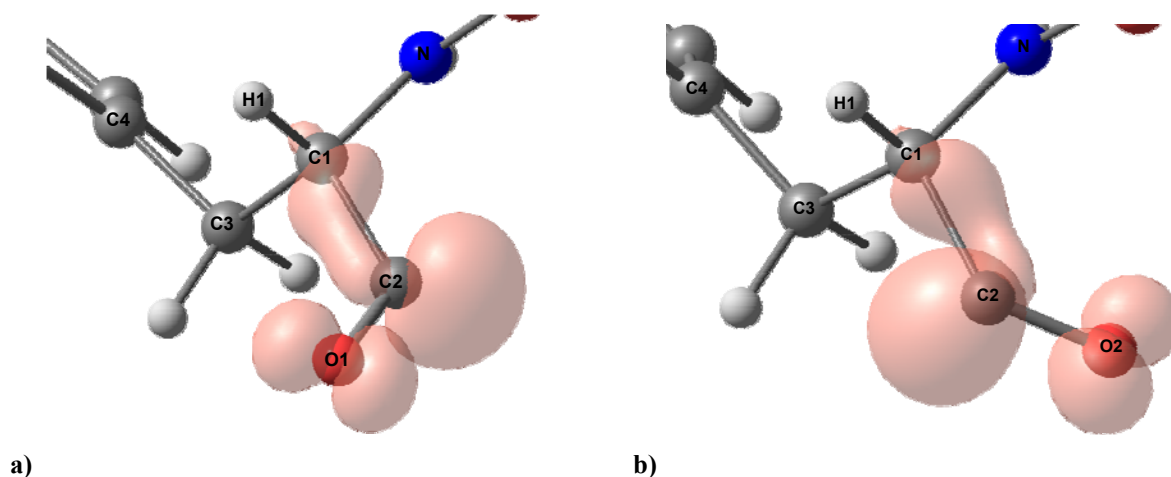


Figur 4.18: σ -radikal, danna som ein sekundærprosess etter ein reduksjon av karboksylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin. Det vil vere to moglege slike radikal i N-acetyl-L-tyrosin, a) og b), alt etter kva av oksygenatoma O1, O2 som vert spalta av. Begge radikala er potensielle kandidatar til radikal III observert i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur.

4.5.3 DFT-berekningar av σ -radikal

σ -radikala i 4.18 a) og b) vart konstruerte ved å fjerne høvesvis O2 og H(O2), og O1 og H(O2) frå den opphavlege molekylstrukturen til N-acetyl-L-tyrosin. Torsjonsvinklane til C1, C2, H1 og O1/O2 fekk optimalisere fritt, saman med alle bindingslengder og alle

bindingsvinklar i radikala. Torsjonsvinklane i resten av molekylet er for begge berekningane sette som konstante for å lette DFT-berekningane noko. Figur 4.19 viser dei positive isospinntettleikane frå DFT for dei to radikala a) og b). Figuren viser at størsteparten av spinnnet vil ligge i same plan som C2=O-bindinga for begge radikala. I tillegg spreier spinnnet seg over i C2-C1-bindinga og det vert indusert ei kopling til H1.



Figur 4.19: Positiv isospinntettleiksfordeling henta frå DFT-berekningane for σ -radikala i 4.18 a) og 4.18 b). Radikala er potensielle kandidatar til radikal III danna i N-acetyl-L-tyrosin krystallar etter bestråling ved 295 K. Konturverdien er 0,013458 a. u. for dei viste spinnoverflatene.

Tabell 4.9: Hyperfinkoplingstensorar for σ -radikala i figur 4.19 a) og 4.19 b), berekna ved hjelp av DFT. Radikala er konstruerte ved å fjerne H(O1) og høvesvis O1/O2 frå den opphavlege strukturen til N-acetyl-L-tyrosin. Torsjonsvinklane til H1, C1, C2 og O1/O2 er sett som variable saman med alle bindingsvinklar og alle bindingslengder. Resten av torsjonsvinklane i radikala er sett som konstante.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H1 (DFT)	18,06	11,80	29,86	0,129	0,477	0,870
		-1,59	16,47	0,935	0,234	-0,266
		-10,21	7,85	-0,330	0,847	-0,416

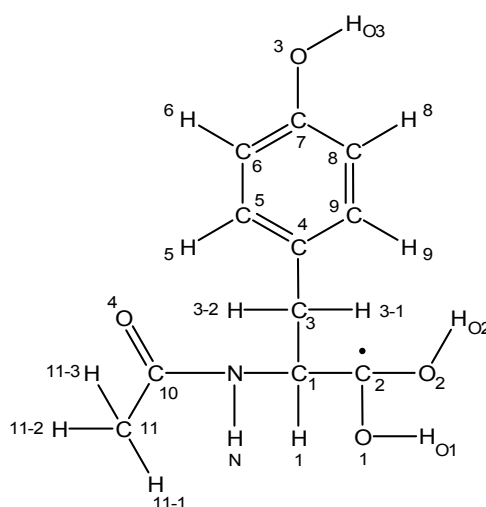
Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H1 (DFT)	-11,65	14,78	3,13	0,129	0,433	0,892
		-5,42	-17,07	0,992	-0,071	-0,108
		-9,36	-21,01	0,017	0,899	-0,438

Tabell 4.9 a) viser den DFT-berekna H1-tensoren for radikalet i figur 4.18 a), medan tabell 4.9 b) viser H1-tensoren for radikalet i figur 4.18 b). Av tabellane kan ein merke seg at

eigenvektorane for dei to koplingane til H1 i tabell 4.9 a) og b) er svært like. Prinsipalverdiane til dei to koplingane avviker derimot vesentleg. Av H1-tensorane i dei to tabellane er det tensoren i tabell 4.9 a) som ser ut til å ha best samsvar med den eksperimentelle kopling 8+, variant (ii), i tabell 4.8. H1-tensoren i 4.9 a) har likevel mindre isotropverdi og større anisotrope verdiar enn 8+ (ii). Eigenvektorane til dei største prinsipalverdiane til kopling 8+, variant (ii), frå tabell 4.8 og H1-tensoren frå tabell 4.9 a), avviker med $32,1^\circ$, eigenvektorane til dei intermediære prinsipalverdiane avviker med $65,6^\circ$ medan eigenvektorane til dei minste prinsipalverdiane avviker med $65,2^\circ$. Oppsummert svarar ikkje dei DFT-berekna tensorane til radikalmodellane i figur 4.18 a) og b) til kopling 8+ knytt til radikal III ved romtemperatur. DFT er sjølvstendig ingen fasit og det kan tenkast at det eksperimentelt skjer endringar i radikalstrukturen som ikkje vert gjenspegla i DFT-berekningane med dei føringane som er lagt på systemet.

4.5.4 Kandidat til radikal III: Protonert karboksylanion

Schonlandvariant (i) i tabell 4.8 har form som ei regulær β -kopling og avviket mellom t_{maks}^β og retninga til C2-H1 er berre $11,6^\circ$. Oksygen har som kjent stor elektronaffinitet og ved innfangning av eit elektron på O1 kan ein få danna eit karboksylanion. I eit slikt anion vil truleg størsteparten av det upara spinnnet vere lokalisert i $2p_z$ -orbitalen til C2. Anion er normalt svært reaktive og vil difor hovudsakleg vere strålingsprodukt ein ser ved låge temperaturar. Ein mogleg sekundærprosess er at anionet trekkjer til seg H^+ frå omgjevnadane og dannar eit sokalla protonert anion som truleg vil vere noko meir stabilt, sjå figur 4.20 og figur 6.2.

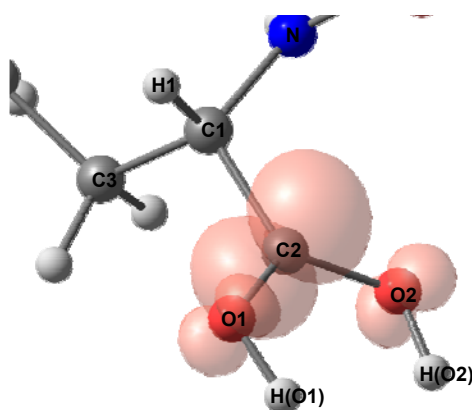


Figur 4.20: Radikalstruktur for eit protonert karboksylanion tenkt danna som ein sekundærprosess i eit N-acetyl-L-tyrosin-molekyl etter elektroninnfangning på O1. Radikalet er ein potensiell kandidat til radikal III observert i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur,

Det protonerte karboksylanionet i figur 4.20 gjev grunnlag for β -koplingar til H1, H(O2) og det tilkommande H(O1). Radikal III har berre rom for ei oppløyst kopling og sidan denne koplinga er tilstades både i spektra frå ikkje-deuterte og deuterte krystallar, er den høgst truleg ei kopling til eit proton som ikkje let seg byte ut med deuterium. Dette indikerer at kopling 8 ikkje er knytt til H(O1) eller H(O2). Dersom radikal III er eit protonert karboksylanion må difor koplingane til H(O1) og H(O2) vere små og uoppløyste. Det vil i praksis seie at dei må ligge planet utspent av O1, C2 og O2. Ved hjelp av DFT kan dei teoretiske koplingane til H1, H(O1) og H(O2) i den skisserte radikalstrukturen bereknast, sjå neste kapittel.

4.5.5 DFT-berekningar av protonert karboksylanion

Hyperfinmatrisene til det protonerte karboksylanionet i figur 4.20 har vorte estimert ved hjelp av DFT. Elektroninnfanging på O1 vil gje ein spinntettleik på C2-atomet som vil indusere β -koplingar til H(O2) og H1. Storleiken på desse vil vere bestemt av dihedralkvinklane til H(O2) og H1 i forhold til $2p_z$ -orbitalen på C2. I ein uskadd molekylstruktur er desse høvesvis $88,0^\circ$ og $54,0^\circ$. Protonering på O1 vil gje opphav til enno ei β -kopling til det tilkommande protonet H(O1). For å gjere denne β -koplinga så lita som mogleg, vart H(O1) posisjonert i planet utspent av O1, C2 og O2. I berekningane fekk C1, C2, C3 og H1 optimalisere fritt medan O1, H(O1), O2 og H(O2) vart låste til å ligge i same plan. Torsjonskvinklane i resten av radikalet vart og låste for å lette berekningane noko.



Figur 4.21: Positiv isospinntettleiksfordeling for eit protonert karboksylanion, som er potensiell kandidat til radikal III observert danna i N-acetyl-L-tyrosin-krystallar etter bestråling ved romtemperatur. Spinntettleikane er henta frå DFT-berekningane. Konturverdien er 0,013458 a. u. for dei viste spinnoverflatene.

Figur 4.21 viser isospinnflatene henta ut frå DFT-berekningane for det skisserte protonerte karboksylanionet i N-acetyl-L-tyrosin. Som forventta vil størsteparten av spinnnet vere lokalisert til C2-atomet, men figuren viser at det og vert spinn i $2p_z$ -orbitala på O1 og O2. Tabell 4.10 viser hyperfinkoplingstensorane frå DFT-berekningane. Ei samanlikning mellom H1-tensoren frå tabell 4.10 og 8+-tensoren, variant (i), frå tabell 4.8 viser eit godt samsvar både i isotrope og anisotrope verdiar. Avviket mellom t_{maks}^{β} -retningane til dei to tensorane er berre $9,9^{\circ}$. Men tabell 4.10 viser at også H(O2) og H(O1) opplever koplingar av ein viss storleik i det protonerte karboksylanionet. Desse koplingane er resultat av spinntettleikane på O1 og O2 som gjev opphav til α -type koplingar til dei to protona. I dei eksperimentelle resultata for radikal III er det ikkje rom for koplingar av denne storleiken (sjå t.d. figur 4.22). Desse erkjenningane kan leie til to konklusjonar. Anten at radikal III ikkje er eit protonert karboksylanion eller at DFT overestimerar koplingane til H(O1) og H(O2). Sjå vidare drøfting i kapittel 6.

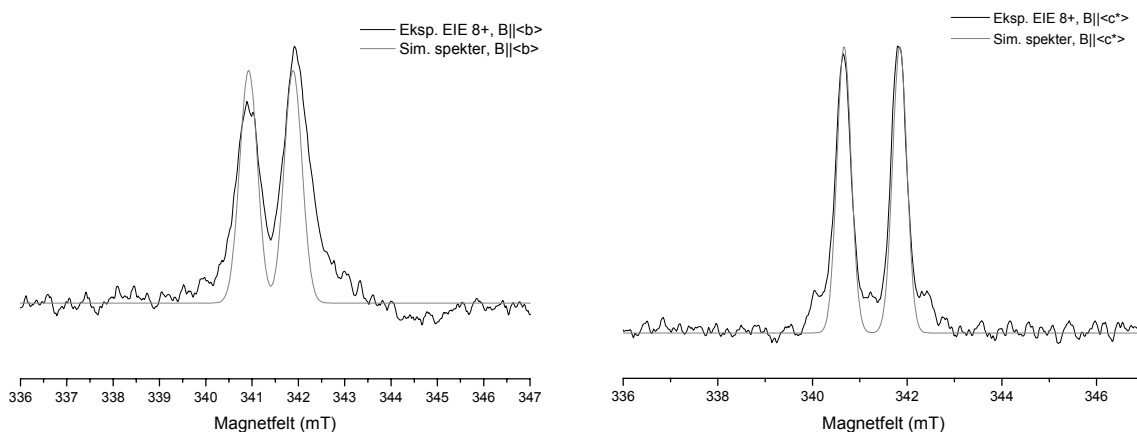
Tabell 4.10: Hyperfinkoplingstensorar for det **protonerte karboksylanionet** i figur 4.20, berekna ved hjelp av DFT. Radikalet er konstruert ved å addere eit proton på O2-posisjon i eit uskadd N-acetyl-L-tyrosin-molekyl. C1, C2, C3 og H1 har saman med alle bindingslengder og alle bindingsvinklar fått optimalisere fritt. Torsjonsvinklane i resten av radikalet vart låste.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H1 (DFT)	29,30	10,46	39,76	-0,277	0,307	0,911
		-4,02	25,28	-0,084	0,936	-0,341
		-6,44	22,86	0,957	0,171	0,233
H(O1) (DFT)	-7,25	16,50	9,25	0,763	-0,228	-0,604
		-6,20	-13,45	0,226	0,901	-0,081
		-10,30	-17,55	0,605	-0,075	0,793
H(O2) (DFT)	-7,18	16,88	9,70	-0,502	0,213	0,838
		-6,32	-13,50	0,283	0,956	-0,074
		-10,57	-17,75	0,818	-0,200	0,540

4.5.6 Simuleringar radikal III

Resultata og analysane i kapittel 4.5.1-4.5.5 viste at både σ -radikala og det protonerte karboksylanionet har manglar som modellar for radikal III ved romtemperatur. Med utgangspunkt i DFT-berekningane for dei tre radikala er det likevel H1-tensoren, i det protonerte karboksylanionet i tabell 4.10, som har best samsvar med den eksperimentelle tensoren 8+ (variant (i)) i tabell 4.8.

Ved hjelp av KVASAT (Lund *et al.*, 1978; Sagstuen *et al.*, 2000) kan EPR-absorpsjonsspekter simulerast og samanliknast med dei eksperimentelle EIE-spektra. Med utgangspunkt i Schonlandvariant (i) av kopling 8+ er dei simulerte absorpsjonsspektra (grå kurve) langs $\langle b \rangle$ - og $\langle c^* \rangle$ -aksen etablerte, sjå figur 4.22. Dei svarte spektra er dei eksperimentelle EIE-spektra for kopling 8+ for deuterte krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 295 K og målte ved 240 K. Figuren viser som forventat at EIE-spekteret til kopling 8 ikkje har rom for koplingar av storleiken til H(O1) og H(O2) frå tabell 4.10.



Figur 4.22: Dei svarte spektra er dei eksperimentelle EIE-spektra for kopling 8+ observerte i deuterte einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur og målte ved om lag 240 K. Dei grå spektra er simulerte EPR-absorpsjonskurver med utgangspunkt i kopling 8+ variant (i) frå tabell 4.8. I spektra til venstre er magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen og i spektra til høgre er magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen.

Dei små skilnadane som observerast mellom dei simulerte absorpsjonsspektra og dei eksperimentelle EIE-spektra kan skuldast ulike effektar. For det første er EIE-spekteret eit delvis metta EPR-spekter. For det andre vil kryssrelaksasjonsprosessar kunne påverke EIE-spektra, noko som ikkje er tilfelle for EPR-spektra. Dette kan medføre både endringar i linjeintensitet og endringar i linjebreidder i EIE-spekteret samanlikna med i EPR-spekteret.

Resultata for radikal III vert saman med resultata for dei andre romtemperaturradikala I og II, oppsummerte i kapittel 6. Her vert og tenkte dannelsesmekanismar for dei ulike radikala skisserte og samanhengen mellom lågtemperaturradikal (sjå kapittel 5) og romtemperaturradikal vert drøfta.

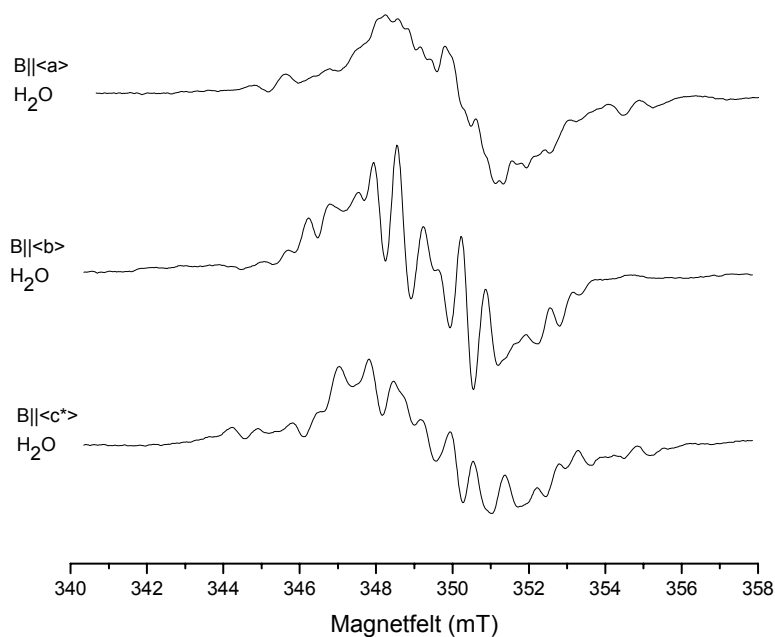
5 Resultat og analyse av lågtemperaturdata

For lågtemperaturreksperimenta vart einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin monterte på koparstavar, plasserte i ein lågtemperatur prøvehalдар (sjå kapittel 3.6) og nedkjølte til om lag 77 K med flytande nitrogen. Temperaturen vart halden i dette området medan både røntgenbestrålingane og EPR/ENDOR/EIE-målingane vart utførte.

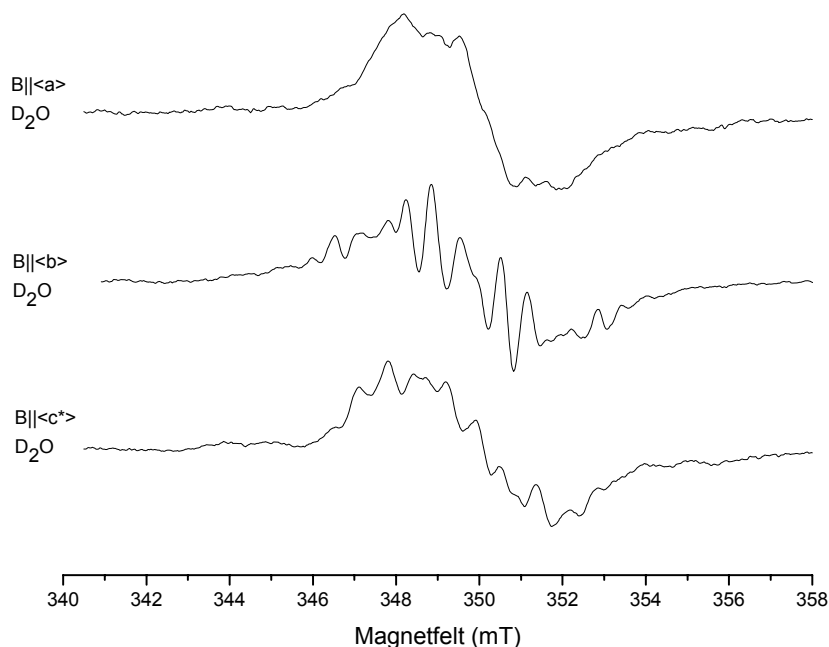
5.1 EPR-resultat (77 K)

Som i romtemperaturmålingane vart EPR-spektra ved 77 K teke opp medan krystallane vart rotert i ti graders intervall om dei tre ortogonale referanseaksane $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c^* \rangle$. Figur 5.1 viser førstederiverte EPR-spekter for ikkje-deuterte krystallar bestrålte og målte ved 77 K, med magnetfeltet retta parallelt med kvar av referanseaksane. EPR-spektra ved 77 K var relativt komplekse og signal-støyforholdet var noko redusert samanlikna med romtemperaturspektra. Av figur 5.1 og som seinare analyse vil vise, inneheld EPR-spektra ved 77 K bidrag frå minst tre ulike radikal. I seinare kapittel vil desse verte nærmare undersøkte; to radikal A og B som gjev linjebidrag i sentra av EPR-spektra og eit radikal C som gjev dei breie flankeresonansane i spektra i figur 5.1.

I tillegg til eksperimenta gjort med einkrystallar dyrka i H_2O -løysingar vart det og gjort målingar på einkrystallar dyrka i D_2O . Figur 5.2 viser førstederiverte EPR-spekter for deuterte krystallar. Magnetfeltretninga er parallell med kvar av dei tre referanseaksane $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c^* \rangle$ og dei deuterte krystallane er bestrålte og målte ved 77 K. Ei samanlikning med spektra frå ikkje-deuterte krystallar i figur 5.1 viser visse forskjellar. For det første ser spektra frå deuterte krystallar ut til å ha mindre struktur på flankane enn spektra frå ikkje-deuterte krystallar. Samstundes er linjeintensiteten frå deuterte krystallar noko redusert samanlikna med linjeintensiteten frå ikkje-deuterte krystallar. Dette gjer det vanskeleg å fastslå om endringane i flankeresonansane skuldast slike intensitetsforskjellar eller om flankeresonansane faktisk forsvinn i spektra frå deuterte krystallar. Frå $\langle c^* \rangle$ -aksespektra i figur 5.1 og 5.2 synast det dessutan å vere forskjellar i sentra av spektra. I $\langle b \rangle$ -aksespektra er derimot dei sentrale resonanslinjene tilnærma identiske. Oppsummert er det observert skilnadar i EPR-spektra frå deuterte og ikkje-deuterte krystallar og det verkar sannsynlig at ein eller fleire av resonansane frå radikala A-C vert endra ved deutring. Nøyaktig kva endringane består i er det likevel vanskeleg å fastslå frå EPR-spektra aleine.



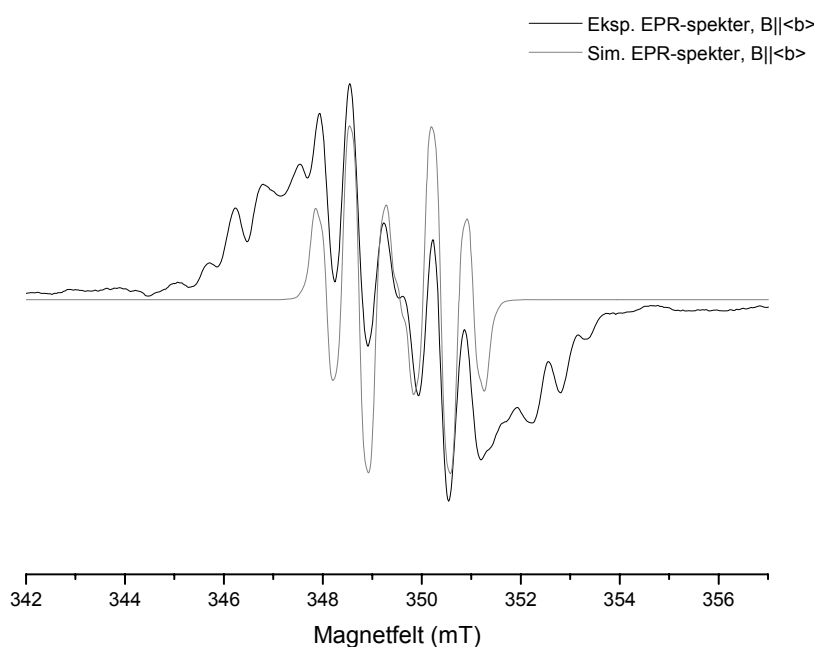
Figur 5.1: 1. deriverte EPR-spekter frå ikkje-deuterte einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte og målte ved 77 K. Det øvre spekteret er teke opp med hovudmagnetfeltet parallelt med $\langle a \rangle$ -aksen (9,7771 GHz), det midtre spekteret med magnetfeltet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen (9,7827 GHz) og det nedre spekteret med magnetfeltet parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen (9,7937 GHz).



Figur 5.2: 1. deriverte EPR-spekter frå deuterte einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte og målte ved 77 K. Det øvre spekteret er teke opp med hovudmagnetfeltet parallelt med $\langle a \rangle$ -aksen (9,7816 GHz), det midtre spekteret med magnetfeltet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen (9,7856 GHz) og det nedre spekteret med magnetfeltet parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen (9,7802 GHz).

5.1.1 Radikal A

EPR-spekteret teke opp med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen ved 77 K (sjå figur 5.1 og 5.2), har store likskapstrekk med $\langle b \rangle$ -aksespekteret ved romtemperatur (sjå t.d. figur 4.1). I $\langle b \rangle$ -aksespekteret ved romtemperatur skil det seg tydeleg ut fem resonanslinjer i senteret av spekteret. Desse fem resonanslinjene vart tilskrivne radikal I som vart identifisert til å vere eit tyrosylradikal. I $\langle b \rangle$ -aksespekteret ved 77 K finn ein att dei same fem resonanslinjene, men midtlinja ved om lag 349,5 mT, ser ut til å fått ei ekstra splitting. Denne ekstra splittinga kan skuldast endringar i splittingskonstanter for tyrosylradikalet og/eller overlapp med resonanslinjer frå andre radikal.



Figur 5.3: Det svarte spekteret er det eksperimentelle EPR-signalet for ein ikkje-deutert krystall bestrålt og målt ved 77 K. Mikrobølgefrequensen er 9,7827 GHz. Det grå spekteret viser det simulerte signalet frå tyrosylradikalet med tensorane 1+, 2+, H5, H9, H(3-1) og H(3-2) frå tabell 4.1 og 4.2 som utgangspunkt. Isotropverdien til tensor H(3-1) er auka med 4,0 MHz. Magnetfeltet er for begge spektra er retta langs $\langle b \rangle$ -aksen.

I figur 4.11 vart det 1.deriverte EPR-spekteret til radikal I (tyrosylradikalet ved romtemperatur) simulert med utgangspunkt i koplingane 1+, 2+, H5, H9, H(3-1) og H(3-2) frå tabell 4.1 og 4.2. Det svarte spekteret i figur 5.3 er det eksperimentelle EPR-spekteret langs $\langle b \rangle$ -aksen ved 77 K for ein ikkje-deutert krystall. Det grå spekteret er eit simulert EPR-spekter med utgangspunkt i dei same koplingane som for det simulerte EPR-spekteret i figur 4.11, men isotropverdien til β -koplinga H(3-1) er auka med 4 MHz. Figur 5.3 viser at denne

auka nær reproduserar splittinga til midtlinja i $\langle b \rangle$ -aksespekteret ved 77 K. Det er ikkje uvanleg at endringar i temperatur fører til endringar i radikalstruktur og dette vil spesielt kunne påverke β -koplingar. Den ekstra splittinga observert i lågtemperaturspektra skuldast difor truleg ei auke av a_2 (sjå figur 4.2) som er knytt til H(3-1), slik at dei sentrale resonanslinjene i $\langle b \rangle$ -aksespekteret går frå eit tilnærma 1:2:2:2:1-intensitetsforhold ved romtemperatur til eit tilnærma 1:2:1:1:2:1-intensitetsforhold ved 77 K. Konklusjonen som synast rimeleg å trekkje ut frå desse observasjonane, er at tyrosylradikalet vert danna allereie ved temperaturar under 77 K. Lågtemperaturvarianten av tyrosylradikalet vert kalla radikal A i seinare analyser.

For den vidare analysen av radikaldanning i N-acetyl-L-tyrosin ved 77 K vert ENDOR- og EIE-resultata nytta.

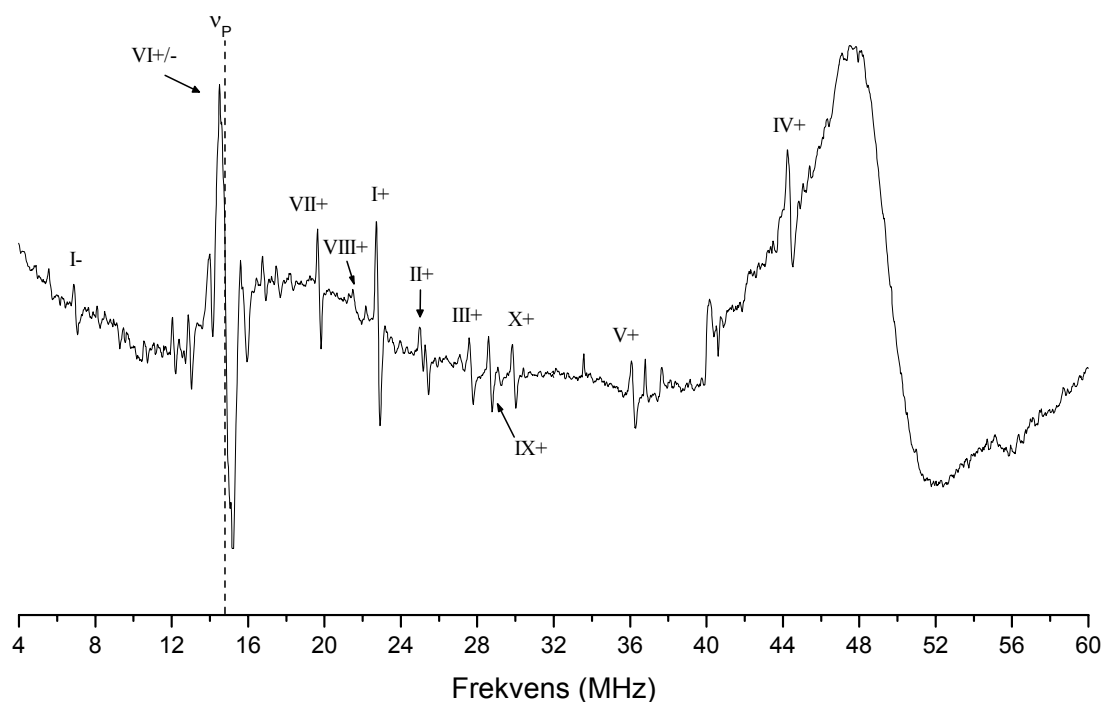
5.2 ENDOR og EIE av N-acetyl-L-tyrosin (77K)

I ENDOR-eksperimenta har magnetfeltet i dei fleste forsøka vorte låst til ei av dei sentrale resonanslinjene i EPR-spekteret og ENDOR-spektra vart tekne opp for kvar femte grad i tre ortogonale rotasjonsplan. I figur 5.4 er eit 1.derivert ENDOR-spekter for ein ikkje-deutret krystall vist. Retninga til hovudmagnetfeltet er langs referanseakse $\langle c^* \rangle$ og friprotonfrekvensen er markert med ν_p . Dei observerte koplingane er nummererte I-X.

Resonanslinje I-VIII kan følgjast i tre ortogonale rotasjonsplan medan resonanslinjene IX og X berre let seg følgje ved rotasjon om $\langle a \rangle$ -aksen. I tillegg er det resonanslinjer i figur 5.4 som ikkje er nummererte, til dømes resonanslinjene nær friprotonfrekvensen og resonanslinja som overlappar kopling II+. Dette er resonanslinjer som berre er observerte ved visse orienteringar av magnetfeltet.

Som i romtemperaturstudiet vart det gjort ENDOR-målingar med magnetfeltet låst på ulike posisjonar i EPR-spektret. Frekvensendringane til ENDOR-resonanslinjene ved variasjon av magnetfeltet, indikerte om resonanslinjene var høgfrekvente eller lågfrekvente greiner av koplingar. I figur 5.4 er resultata markerte som +/- . I tillegg viste desse forsøka at resonanslinjene til kopling I \pm , II+, III+, IV+, VII+ og IX+ forsvann frå ENDOR-spekteret når magnetfeltet vart låst til flankane i EPR-spekteret. Kopling V+ og kopling X+ var derimot synleg i ENDOR-spekteret både med magnetfeltet låst til resonanslinjene på flankane og til resonanslinjene i senteret av EPR-spekteret. ENDOR-intensiteten til kopling VIII+ er relativt låg og det er difor vanskeleg å avgjere om den er tilstades i ENDOR-spekteret når magnetfeltet vert låst til flankane i EPR-spekteret. For magnetfeltet orientert parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen vart kopling VI \pm overlappa av den sterke resonansen ved friprotonfrekvensen

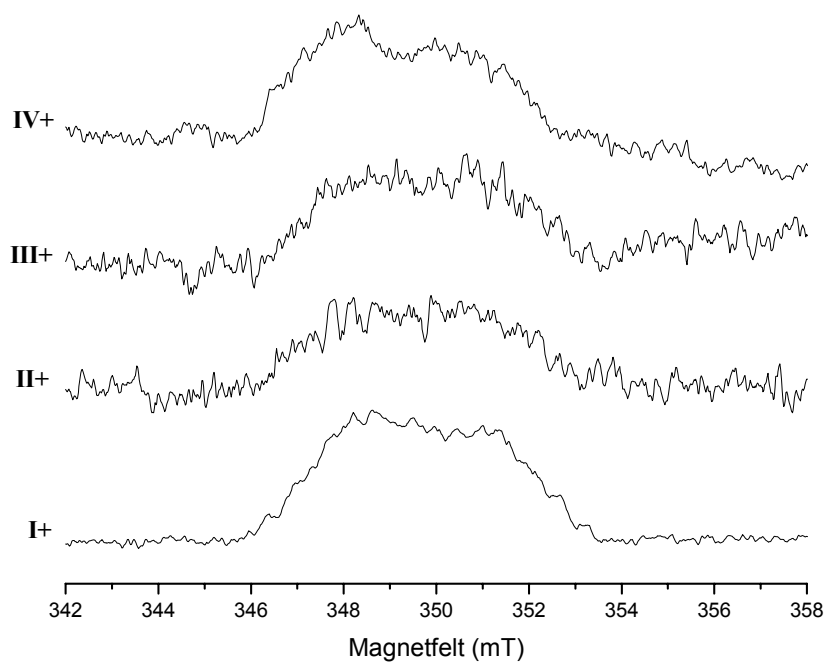
ν_P . Liknande målingar vart gjort med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen, men her og ligg resonanslinjene $VI \pm$ svært nær friprotonfrekvensen. Langs $\langle a \rangle$ -aksen er det berre teke opp ENDOR-spekter med magnetfeltet låst i senteret av spekteret.



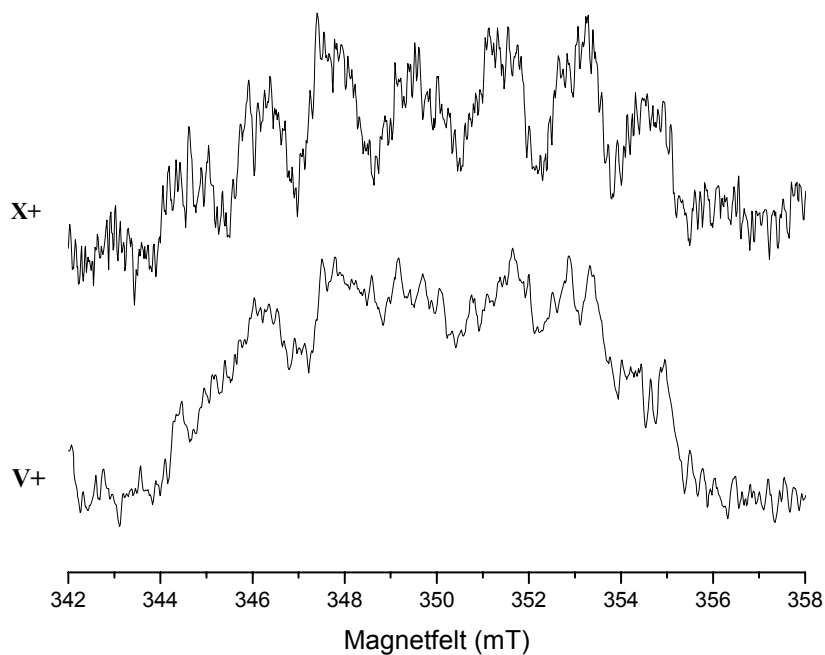
Figur 5.4: 1.derivert ENDOR-spekter av ein ikkje-deutert N-acetyl-L-tyrosin-krystall bestrålt og målt ved 77 K. Magnetfeltet er låst til ei av dei sentrale EPR-linjene og retta parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen. Koplingane er nummererte I-X og +/- markerer høgfrekvent/lågfrekvent koplingsgrein. Resonansfrekvensen til eitt fritt proton, $\nu_P \approx 14,8$ MHz, er avmerka med stiila linje.

For å bestemme om koplingane I-X stammar frå vekselverknadar med proton som let seg byte ut med deuterium, vart det gjort ENDOR-målingar på deuterte krystallar. Av koplingane markerte i figur 5.4, var det berre kopling V som ikkje let seg identifisere i spektra frå deuterte krystallar. Det kan tyde på at kopling V er knytt til eit proton som let seg deutere i tungtvatn.

Figur 5.5 viser EIE-spektra for kopling I+, II+, III+ og IV+ når magnetfeltet er parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen. Koplingane gjev opphav til EIE-spekter med same halvverdbreidder på omlag 4,7 mT langs $\langle b \rangle$ -aksen. Dette indikerar at desse koplingane er knytte til eit og same radikal, som vidare er kalla radikal B.



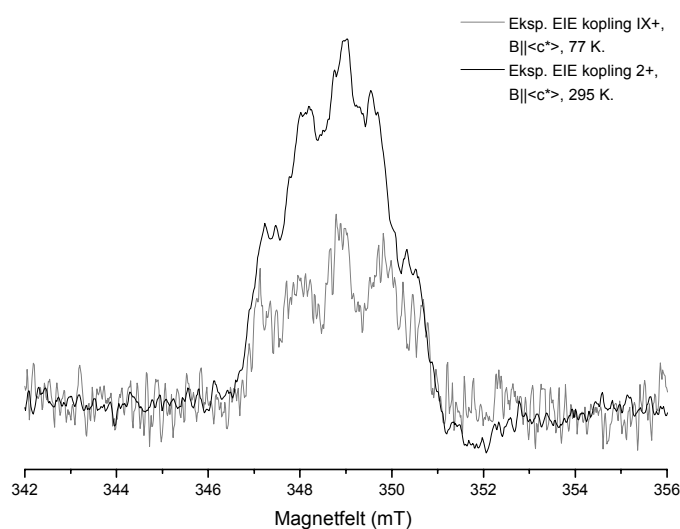
Figur 5.5: EIE-spekter for ENDOR-resonanslinje I+, II+, III+ og VI+ (sjå figur 5.4) observerte i ikkje-deuterte einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte og målte ved 77 K. Alle spektra vart teke opp ved rotasjon om $\langle a \rangle$. Magnetfeltet var retta parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen og låst til ei av resonanslinjene i senteret av EPR-spekteret.



Figur 5.6: EIE-spekter for ENDOR-resonanslinje V+ og X+ (sjå figur 5.4) observerte i ikkje-deuterte einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte og målte ved 77 K. Spektra vart teke opp ved rotasjon om $\langle a \rangle$. Magnetfeltet var retta parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen og låst til ei av resonanslinjene i senteret av EPR-spekteret.

Figur 5.6 viser EIE-spektra for kopling V+ og kopling X+ med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen. Spektra har ei halvverdibreidde på rundt 10,6 mT og det øvste spekteret ser ut til å bestå av sju resonanslinjer. Radikalet som gjev opphav til desse EIE-spektra vert i dei vidare analysane kalla radikal C.

For kopling VI \pm , VII+ og VIII+ lukkast det ikkje å detektere noko eintydig EIE-signal. Både for svak intensitet på nokre av ENDOR-linjene og for lågt signal/støy-forhold kan vere medverkande årsaker til dette. EIE-signalet med rf-feltet låst til resonanslinje IX+ med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen, viste ein struktur med ei halvverdibreidde på om lag 3,5 mT som ikkje tilsvarte EIE-spektra til verken radikal B eller C. Resonanslinje IX+ let seg som tidlegare nemnt, berre følgje ved rotasjon om $\langle a \rangle$ -aksen, men i dette planet har den visse likskapstrekk med kopling 2+ som er assosiert til radikal I ved romtemperatur (tyrosylradikalet). I figur 5.7 er EIE-spekteret til kopling IX+ ved 77 K plotta saman med EIE-spekteret til kopling 2+ ved romtemperatur. Begge EIE-spektra er tekne opp med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen. Mikrobølgjefrekvensen er justert slik at spektra overlappar. Dersom ein ser bort frå intensitetsforskjellane ser det ut til at EIE-spekteret til kopling IX+ ved 77 K har eit godt samsvar med EIE-spekteret til kopling 2+ frå romtemperaturstudiet. Figur 5.7 støttar slik opp under hypotesen i kapittel 5.1.1, der tyrosylradikalet vart føreslått å vere tilstade både ved 77 K og ved 295 K. Andre resonanslinjer frå tyrosylradikalet, radikal A, kunne ikkje observerast i ENDOR-spektra ved 77 K.



Figur 5.7: Det grå spekteret er EIE-spekteret til ENDOR-resonanslinje IX+ (sjå figur 5.4) observert i ikkje-deuterte einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 77 K. Det svarte spekteret er EIE-spekteret til ENDOR-resonanslinje 2+ assosiert til radikal I, observert i deuterte einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 295 K. Begge spektra er teke opp ved rotasjon om $\langle a \rangle$ med magnetfeltet retta parallelt med $\langle c^* \rangle$ -aksen og låst i senteret av EPR-spekteret. Mikrobølgjefrekvensen er justert til 9,7805 GHz for begge spektra.

Før den vidare analysen kan det vere nyttig med ei oppsummering av resultata så langt. Dei ulike koplingane observert ved 77 K er ved hjelp av EIE-spektra og andre analyser sorterte til tre radikal A, B og C. Radikal A er identifisert som tyrosylradikalet ved 77 K og kopling IX⁺ er knytt til dette radikalet. IX⁺ forsvinn frå ENDOR-spekteret når magnetfeltet vert låst til flankane, men den er synleg i spektra frå både deutrerde og ikkje-deutrerde krystallar. IX⁺ let seg berre følgje ved rotasjon om <a> og det er difor ikkje etablert nokon hyperfinkoplingstensor for denne koplinga.

ENDOR-resonanslinjene I-IV er knytte til eit radikal B, som gjev opphav til EIE-spekter med ei breidde på om lag 4,7 mT med magnetfeltet retta langs -aksen. Ei slik breidde er konsistent med at ENDOR-resonanslinjene for dette radikalet ikkje er synlege med magnetfeltet låst til flankane i EPR-spekteret. Resonanslinjene I-IV er tilstades både i spektra frå deutrerde og ikkje-deutrerde krystallar og dei er difor truleg ikkje knytte til proton som let seg deutrerde.

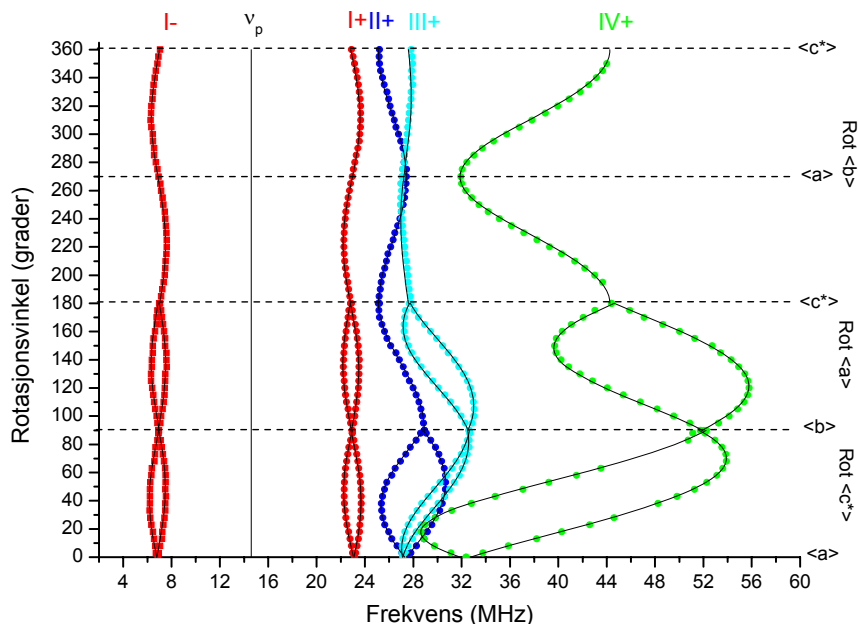
Resonanslinje V⁺ og X⁺ er tilknytte radikal C som gjev opphav til EIE-spekter med breidde på 10,6 mT når magnetfeltet er retta langs <c*>-aksen. Resonanslinjene forsvinn ikkje frå ENDOR-spekteret med magnetfeltet låst til flankane i EPR-spekteret. Kopling V⁺ ser ut til å forsvinne i spektra frå deutrerde krystallar medan kopling X⁺ er observert i spektra både frå deutrerde og ikkje-deutrerde krystallar. Kopling X⁺ er det ikkje etablert hyperfintensor for sidan den berre er observert ved rotasjon om <a>-aksen. Den vidare analysen av radikal C dreiar seg difor i hovudsak om kopling V⁺.

Dei siste tre observerte koplingane VI[±], VII⁺ og VIII⁺, har det ikkje lukkast å assosiere til bestemte radikal. Hyperfintensorane for koplingane er oppgjevne i appendiks C. Koplingane er relativt små og retningane let seg ikkje knyte til bestemte protonbindingsretningar i krystallen. På grunn av den sparsommelege informasjonen dei eksperimentelle resultata gjev om kopling VI⁺, VII⁺ og VIII⁺, vert koplingane ikkje drøfta vidare. I tillegg er det resonanslinjer som berre har vorte observerte ved visse orienteringar og som ein difor ikkje har hyperfintensorar for (jamfør figur 5.4). Vidare i kapittel 5 vert radikal B og C analyserte og forsøkt identifiserte.

5.3 Radikal B

Figur 5.8 viser frekvensvariasjonen for ENDOR-linjene I-IV knytte til radikal B som funksjon av rotasjonsvinkel i tre ortogonale rotasjonsplan. Lågfrekvente greiner er markerte med firkantar medan høgfrekvente greiner er markerte med sirkclar.

Frå dei eksperimentelle datapunkta viste i figur 5.8, er dei tilhøyrande hyperfinkopplings-tensorane berekna. Som vanleg vil Schonland sin tvetydnad gje to moglege variantar av hyperfintensoren, men i tabell 5.1 er berre ein av variantane for kvar tensor lista. For kopling $I\pm$ ser det ut som at den andre varianten er ufysikalsk fordi den gjev feil forteikn på dei anisotrope verdiane i forhold til ei regulær β -kopling. For kopling $II+$, $III+$ og $IV+$ er forskjellen mellom dei to variantane svært små og ein av variantane er tilfeldig valt. Det vil i tillegg vere to moglege kombinasjonar på forteikna til eigenvektorane til kvar tensor. Dei to kombinasjonane høyrer til kvart sitt molekyla i einingscella og er relaterte til einannan ved forteiknskifte på eigenvektoren langs $\langle b \rangle$. I tabell 5.1 er ein av kombinasjonane for kvar kopling vist. Frå tensorane i tabell 5.1 kan variasjonane til linjeposisjonane bereknast og desse er viste som heiltrekte kurver i figur 5.8.



Figur 5.8: Observerte variasjonar i ENDOR-resonansfrekvensar for kopling I-IV knytte til radikal B observert i ikkje-deutrerde krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte og målte ved om lag 77 K. Dei heiltrekte kurvene viser frekvensvariasjonane til ENDOR-linjene berekna med tensorane i tabell 5.1 som utgangspunkt.

Resonansfrekvensen til eitt fritt proton, $\nu_p \approx 14,8$ MHz, er avmerka med heiltrekt linje.

Tabell 5.1: Hyperfinkoplingstensorar for kopling I-IV knytte til **radikal B** observert i ikkje-deuterte krystallar av N-acetyl-L-tyrosin, bestrålte og målte ved om lag 77 K. Tala i parentes representerer standardavviket til det siste talet i den lista verdien.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar			$\Delta\psi^a$ (grader)
				<a>		<c*>	
I-	16,06 (1)	2,52 (2)	18,58 (2)	0,604 (2)	-0,585 (71)	0,540 (158)	15,6/1
		-1,23 (2)	14,83 (2)	0,727 (3)	0,682 (95)	-0,074 (146)	
		-1,29 (2)	14,77 (2)	-0,325 (2)	0,438 (180)	0,838 (15)	
I+	15,98 (1)	2,75 (2)	18,73 (2)	0,614 (3)	-0,570 (30)	0,546 (71)	15,0/1
		-1,31 (2)	14,67 (2)	0,731 (2)	0,671 (47)	-0,122 (66)	
		-1,45 (2)	14,53 (2)	-0,297 (2)	0,474 (80)	0,829 (12)	
II+	24,31 (1)	7,27 (2)	31,58 (2)	0,603 (1)	0,798 (4)	-0,004 (22)	6,3/2
		-3,39 (2)	20,92 (2)	0,784 (1)	-0,593 (4)	-0,185 (17)	
		-3,88 (2)	20,43 (2)	0,150 (2)	-0,108 (28)	0,983 (5)	
III+	28,48 (1)	8,12 (2)	36,60 (2)	-0,134 (1)	0,949 (12)	-0,286 (8)	1,5/3
		-3,77 (2)	24,71 (2)	0,576 (1)	0,309 (1)	0,757 (5)	
		-4,36 (2)	24,12 (2)	0,807 (1)	-0,063 (9)	-0,587 (11)	
IV+	-54,40 (2)	27,19 (4)	-27,21 (3)	0,909 (1)	0,374 (0)	0,185 (1)	16,0/4
		2,13 (4)	-52,27 (3)	-0,331 (0)	0,378 (1)	0,864 (1)	
		-29,33 (4)	-83,73 (3)	-0,254 (1)	0,847 (1)	-0,468 (1)	
Molekylære referansevektorar ^b :							
1. Bindingsretinga C10-C11				0,796	-0,459	0,396	
2. Bindingsretinga C1-H(3-2)				0,525	0,849	0,053	
3. Bindingsretinga C1-H(3-1)				-0,160	0,945	-0,286	
4. Bindingsretinga C1-H1 ^c				0,960	0,271	-0,068	
5. Normalen til planet H(N)-N-C10				-0,244	0,435	0,867	

^a Dette er vinkelavviket mellom eigenvektoren og ein av dei molekylære referansevektorane. Talet til høgre (1/2/3/4/5) markerer kva for ein av referansevektorane avviket gjeld for.

^b Referansevektorane er berekna frå krystallstrukturen, sjå appendiks A.

^c Retninga C1-H1 er berekna ved å summere dei krystallografiske retningane C3-C1 og N-C1 (går dermed ut frå at C1 vert rehybridisert frå sp^3 til sp^2).

5.3.1 Analyse av koplingar, radikal B

Kopling I \pm , II+ og III+ i tabell 5.1 har prinsipalverdiar på form av β -type koplingar.

Retningane til dei største prinsipalverdiane til kopling II+ og III+ ligg svært nær retningane til dei krystallografiske C1-H(3-2)- og C1-H(3-1)-retningane med vinkelavvik på høvesvis 6,3° og 1,5°. Dette er ein god indikasjon på at radikal B har ein signifikant del av den upara spinntettleiken lokalisert til C1. Kopling I \pm er mindre anisotrop enn det ein forventar for regulære β -koplingar (sjå til dømes kopling II+ og III+). Retninga til den største prinsipalverdien (t_{maks}^β) for kopling I \pm har vorte samanlikna med ulike C_α -H β -retningar frå krystallstrukturen utan å finne noko godt samsvar. Men samsvaret mellom t_{maks}^β og retninga til

C10-C11-bindinga er derimot relativt godt med eit vinkelavvik på rundt 15° . Konsekvensane av dette vil verte drøfta i kapittel 5.3.2.

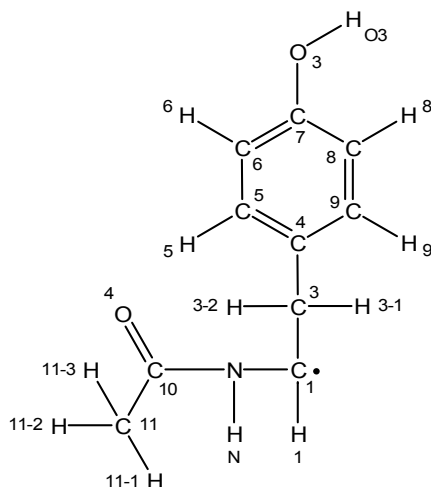
Kopling IV+ har prinsipalverdiar på forma til ei regulær, karbonsentrert α -kopling. Eit estimat for spinntettleiken på det sentrale karbonatomet for kopling IV+ kan finnast ved hjelp av McConnell sin relasjon i likning 2.29. Med ein Q_{CH} -verdi på $-72,8$ MHz vert spinntettleiken på det sentrale karbonatomet, $\rho^\pi \approx 0,75$. Gordy-relasjonen i likning 2.31 gjev med $Q_Z^{dip} = 38,7$ MHz, ein spinntettleik på $\rho^\pi \approx 0,70$. Radikalfragmentet synast med andre ord å vere tilnærma plant og dette er ein god indikasjon på at det sentrale karbonatomet vil verte rehybridisert frå sp^3 til sp^2 . Det gode samsvaret mellom retninga til den intermediære prinsipalverdien til kopling IV+ og retninga normalt på peptidbindinga i eit uskada N-acetyl-L-tyrosin-molekyl (avvik $5,9^\circ$, sjå tabell 5.1), stadfestar ei slik hypotese. Tabell 5.1 viser og at retninga til prinsipalverdien med minst absoluttverdi og retninga berekna som summen av C3-C1- og N-C1-retningane har eit relativt godt samsvar med eit vinkelavvik på $16,0^\circ$.

Dersom ein går ut frå at kopling IV+ er knytt til H1, at kopling II+ er knytt til H(3-2) og at kopling III+ er knytt til H(3-1), kan ein setje opp ulike radikalmodellar som vil gjere slike vekselverknadar moglege (for uskada molekyllstruktur sjå figur 3.1 b). Dei to mest nærliggande modellane i dette tilfellet, er radikal danna ved brot i C1-N-bindinga, som tilsvare deaminering i ei aminosyre, eller radikal danna ved brot i C1-C2-bindinga, som svarar til ei dekarboksylering. Begge desse to modellane vil gje utgangspunkt for stor spinntettleik på C1-atomet og vil kunne gjere greie for både α -koplinga IV+ og dei to β -koplingane II+ og III+. Men β -koplinga I \pm må og passast inn i biletet. I radikalet som vert danna ved brot i C1-N-bindinga vil ein viss del av spinnet truleg vere lokalisert til O1 og den einaste protonkandidaten til kopling I \pm ser ut til å vere H(O2). Ei kopling til H(O2) burde i alle høve la seg deuterte og dermed forsvinne i spektra frå deuterte krystallar. Sidan kopling I \pm er å finne i ENDOR-spektra både for deuterte og for ikkje-deuterte krystallar synast det meir sannsynleg at radikal B er eit dekarboksyliert kation og at kopling I \pm stammar frå ein vekselverknad mellom spinn på C10 og metylgruppa beståande av protona H(11-1), H(11-2) og H(11-3). Vidare vert denne radikalmodellen drøfta.

5.3.2 Kandidat til radikal B: Dekarboksylert kation

Ei dekarboksylering av karboksylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin vil gje radikalstrukturen skissert i figur 5.9. Liknande dekarboksyleringsprodukt er observert i mange aminosyrer og peptid, til dømes i N-formylglysin (Sagstuen *et al.*, forventa publisert 2006), N-acetylglysin (Box *et al.*,

1972; Sinclair og Codella, 1973), glycyl-glysin (Melø, 1972) og hippursyre (Salih *et al.*, 1997).



Figur 5.9: Strukturen til eit dekarboksylert kation i N-acetyl-L-tyrosin. Radikalet er potensiell modell for radikal B, observert i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte og målte ved 77 K.

I tabell 5.1 vart det vist at t_{maks}^{β} til kopling II+ og III+ samsvarte godt med dei molekylære retningsvektorane C1-H(3-2) og C1-H(3-1). Med isotropverdien til kopling II+ og III+ og spinntettleiken berekna frå isotropverdien til kopling IV+ (sjå kapittel 5.3.1) kan dihedralvinklane til H(3-1) og H(3-2) finnast frå Heller og McConnell si likning 2.33. Ved å sette $B_0 = 0$, $B_2 = 126 \text{ MHz}$ og $\rho^{\pi} \approx 0,75$ vert dihedralvinklane knytte til kopling II+ og III+; $\theta_{III+} = \theta_{H(3-1)} \approx 56,7^{\circ}$ og $\theta_{II+} = \theta_{H(3-2)} \approx 59,5^{\circ}$.

Ved å fjerne karboksylgruppa frå eit uskada N-acetyl-L-tyrosin-molekyl og endre posisjonen til H1 slik at retninga til C1-H1-bindinga tilsvarer retninga t_{\min}^{α} til kopling IV+, vert H1 som forventa liggande om lag i planet utspent av peptidbindinga. $2p_z$ -orbitalen på C1 vert tilnærma parallell med retninga normalt på peptidbindinga og dihedralvinklane til H(3-1) og H(3-2) i forhold til $2p_z$ -orbitalet på C1 vert høvesvis $56,8^{\circ}$ og $59,1^{\circ}$. Desse verdiane samsvarer svært godt med dei berekna dihedralvinklane i avsnittet over.

Sidan peptidbindinga er tilnærma plan og sidan H1 ligg i same plan som peptidbindinga, kan ein gå ut frå at ein del av spinnet på C1 vil verte delokalisert over N og C10 i det potensielle dekarboksylerte N-acetyl-L-tyrosin-kationet. Spinn på C10 vil vekselvirke med metylprotona (H(11-1), H(11-2) og H(11-3)) i radikalet. Metylgrupper kan verte påverka av ulike krefter og kan difor ha ulike rørsler og dermed gje grunnlag for ulike spinnvekselverknadar. Dei ulike rørsleane kan til dømes vere rask rotasjon, sakte rotasjon eller meir stegvise rørsler. Metylgrupper kan og vere låste slik at dei ikkje har interne rørsler i det heile teke. Rørsleane

vert ofte regulerte av temperaturen. Spinnvekselverknadane mellom ei roterande metylgruppe og eit upara elektron på nabokarbonatomet kan ikkje lenger behandlast som eit $S=1/2$ og $I=1/2$ system. Det vil ikkje vere mogleg å skilje dei tre metylprotona frå einannan og det er vanleg å sjå på systemet som ei vekselverknad mellom eit elektronspinn med $S=1/2$ og eit kjernespin med $I=3/2$. Ei roterande metylgruppe vil i ENDOR berre gje opphav til ei β -kopling (ikkje tre) og koplinga vil representere snittet av vekselverknadane til dei tre metylprotona. Isotropverdien til koplinga er gjeve ved $a_{iso}^{\beta, methyl} = B \cdot \rho^\pi$, der $B \approx 2,9 \text{ mT} \approx 81 \text{ MHz}$ (Fessenden og Schuler, 1963b). For ei β -kopling til ei roterande metylgruppe vil vektoren t_{maks}^β vere nær retninga til $C_\alpha-C_\beta$, ikkje nær $C_\alpha-H_\beta$ som for ei regulær β -kopling. I tillegg er koplingar til roterande metylgrupper karakterisert ved låge anisotropiar (Sagstuen *et al.*, 1997).

Frå målingane gjort på N-acetyl-L-tyrosin er det berre observert ei β -kopling ($I \pm$) som kan knytast til metylgruppa. Frå tabell 5.1 kan ein merke seg at $I \pm$ er ei kopling med relativt låg anisotropi og at t_{maks}^β -vektoren til kopling $I \pm$ avviker med om lag 15° frå retninga til C10-C11-bindinga. Dette kan indikere at metylgruppa roterar og at kopling $I \pm$, representerer ein snittverdi av spinnvekselverknadane til metylgruppa. Studiar av N-formylglysin (COHNHCH2COOH) viser danning av eit dekarboksylert kation analogt til dekarboksyleringsproduktet føreslått som radikal B i N-acetyl-L-tyrosin (Sagstuen *et al.*, forventa publisert 2006). N-formylglysin kan samanliknast med N-acetyl-L-tyrosin i peptidleddet, men i staden for metylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin har denne sambindinga eit enkelt hydrogenatom bunde til karbonatomet som inngår i peptidbindinga. Frå studiane på det dekarboksylerte N-formylglysinkationet er ein spinntettleik på 0,18 funne for karbonatomet i peptidbindinga. Dersom ein går ut frå at C10 i N-acetyl-L-tyrosin har ein tilsvarande spinntettleik og at $B \approx 81 \text{ MHz}$ (Fessenden og Schuler, 1963b) vert isotropverdien til den roterande metylgruppa, $a_{iso}^{\beta, methyl} \approx 15 \text{ MHz}$. Denne verdien er i samsvar med isotropverdien til den eksperimentelle koplinga $I \pm$, som er om lag 16 MHz.

Dersom metylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin ikkje roterar vil ein i utgangspunktet forvente tre β -koplingar av ulik storleik til dei tre metylprotona, og koplingane vil vere avhengige av dihedralkvinkelen til dei ulike metylprotona i forhold til $2p_z$ -orbitalet på C10. Dersom kopling $I \pm$ er knytt til eit av desse metylprotona (H_β) kan ein estimere dihedralkvinkelen til dette H_β -protonet ved å gå ut frå at C10 har ein spinntettleik på 0,18 (frå N-formylglysin-arbeidet). Med isotropverdien til kopling $I \pm$ på ca. 16 MHz, ein spinntettleik på 0,18, $B_0 \approx 0 \text{ MHz}$ og $B_2 \approx 126 \text{ MHz}$ innsett i likning 2.33, vert dihedralkvinkelen til H_β om lag 33° . Ved å plassere H_β i dei posisjonane som gjev ein slik dihedralkvinkel i forhold til $2p_z$ -orbitalet på C10, kan dei ulike C10- H_β -retningane bereknast. Samanlikna med t_{maks}^β til kopling $I \pm$ gjev dei moglege

C10-H β -retningane avvik på 29° eller meir. Av analysane i dette kapitlet synast det difor rimeleg at metylgruppa i det dekarboksylerte N-acetyl-L-tyrosin-kationet roterer og at I \pm representerer snittverdien av koplingane til metylprotona. Sjå og simuleringane for radikal B gjort med stillestående metylgruppe (figur 5.11) og roterande metylgruppe (figur 5.12) i kapittel 5.3.4.

Frå analysen i kapittel 5.3.1 og 5.3.2 kan ein konkludere med at det dekarboksylerte kationet er ein kandidat til radikal B som har eit godt samsvar med dei eksperimentelle data. I det neste kapitlet vert hyperfinensorane til det dekarboksylerte kationet berekna ved hjelp av DFT og samanlikna med dei eksperimentelle tensorane for radikal B.

5.3.3 DFT-berekningar av dekarboksylert kation

For DFT-berekningane vart karboksylgruppa fjerna frå den uskada molekylstrukturen til N-acetyl-L-tyrosin. Det vart gjort berekningar med ulik grad av optimalisering på dette dekarboksylerte kationet. Når radikalet fekk optimalisere heilt fritt vart retninga til C1-H1 liggande slik at dihedralkvinklane til H(3-1) og H(3-2) vart svært ulike i verdi. Dette medførte at koplingane til H1, H(3-1) og H(3-2) ikkje samsvarte med dei eksperimentelle koplingane II-IV.

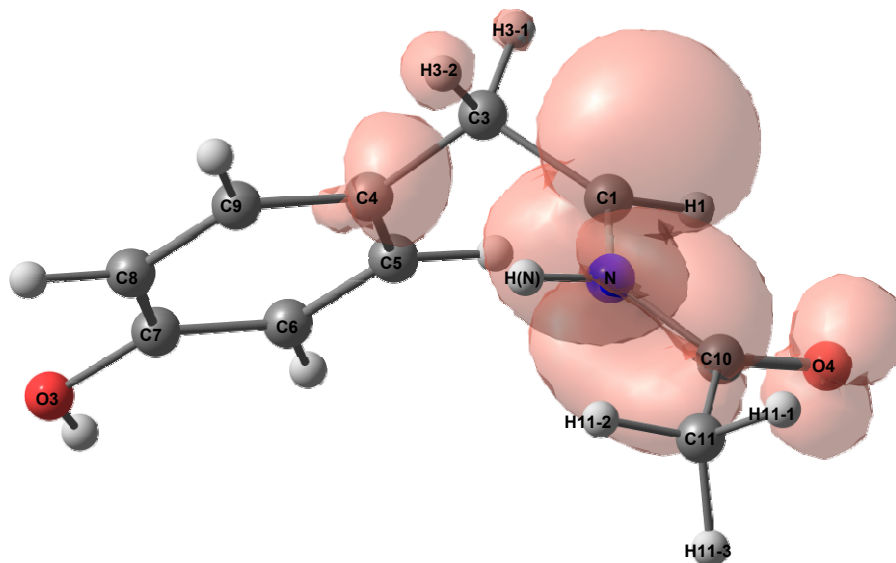
Ei fri optimalisering av radikalstrukturen gjev truleg ikkje noko godt bilete av den reelle situasjonen sidan eit N-acetyl-L-tyrosin-molekylet vil oppleve hydrogenbindingar og andre stabiliserande faktorar til sine nabomolekyl i ein einkrystall. Dei vidare DFT-berekningane vart difor føreteke ved å låse visse vinklar i radikalet. For det første vart retninga til C1-H1 låst slik at den samsvarte med den eksperimentelle eigenvektoren t_{\min}^{α} til kopling IV+. I tillegg vart torsjonsvinklane til H(3-1), H(3-2), C1 og C3 fryste under berekningane. Resten av torsjonsvinklane, samt alle bindingslengder og alle bindingsvinklar, fekk optimalisere fritt. Tabell 5.2 viser hyperfinmatrisene for det foreslåtte dekarboksyleringsproduktet i N-acetyl-L-tyrosin, berekna ved hjelp av DFT.

Frå DFT kan ein og få informasjon om korleis spinntettleiken fordelar seg over den foreslåtte radikalstrukturen og figur 5.10 viser ei slik isospinnfordeling for det dekarboksylerte N-acetyl-L-tyrosin-kationet. Frå figuren ser ein at det er størst spinntettleik i 2p_z-orbitalet på C1 og at denne spinntettleiken induserar ei α -kopling til H1. På trass av at dihedralkvinklane til H(3-1) og H(3-2) i forhold til 2p_z-orbitalet på C1, er tilnærma like store, viser figuren tydelig at spinntettleiken på H(3-2) er større enn på H(3-1). Dette reflekterast i isotropverdiane til dei berekna tensorane H(3-1) og H(3-2) i tabell 5.2. Det er uvisst kvifor DFT-berekninga gjev

ulik spinntettleik på dei to metylenprotona. Frå figur 5.10 observerar vi positiv spinntettleik i C4-C3-bindinga og det er mogleg at denne spinntettleiken er ei medverkande årsak til forskjellen i spinntettleik på dei to β -protona. Summen av isotropverdien til H(3-1) og H(3-2) frå DFT-berekingane (51,5 MHz) og summen av isotropverdiane til II+ og III+ frå eksperimentelle data (52,8 MHz), indikerar likevel eit godt samsvar totalt sett. Dei anisotrope verdiane til H(3-1) og H(3-2) (tabell 5.2) har eit godt samsvar med dei anisotrope verdiane til II+ og III+ (tabell 5.1). t_{maks}^{β} -vektoren til tensor H(3-2) har eit avvik på $5,0^{\circ}$ i forhold til t_{maks}^{β} -vektoren til kopling II+. Ei tilsvarande samanlikning mellom t_{maks}^{β} -vektorene for kopling III+ og H(3-1) gjev eit avvik på $6,1^{\circ}$.

Tabell 5.2: DFT-berekna hyperfinkoplingstensorar for det **dekarboksylerde kationet** foreslått danna i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 77 K. Radikalet er konstruert ved å fjerne karboksylgruppa frå den uskada molekylstrukturen oppgjeven i appendiks A. Torsjonsvinklane til H1, H(3-1), H(3-2), C1 og C2 vart fryste under berekingane. Dei andre torsjonsvinklane, alle bindingslengder og alle bindingsvinklar har fått optimalisere fritt.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
H(11-1) (DFT)	12,12	2,60	14,72	0,428	-0,577	0,695
		-1,15	10,97	0,729	0,675	0,112
		-1,45	10,67	-0,534	0,459	0,710
H(11-2) (DFT)	0,01	3,23	3,24	0,797	-0,413	0,440
		-1,54	-1,53	-0,289	0,379	0,879
		-1,69	-1,68	0,530	0,828	-0,183
H(11-3) (DFT)	12,79	2,59	15,38	-0,544	0,794	-0,271
		-1,15	11,64	0,837	0,490	-0,244
		-1,44	11,35	0,061	0,359	0,931
H(3-2) (DFT)	33,39	8,45	41,84	0,553	0,831	-0,067
		-3,81	29,58	0,723	-0,517	-0,458
		-4,64	28,75	0,415	-0,205	0,886
H(3-1) (DFT)	18,06	9,04	27,10	-0,147	0,911	-0,385
		-3,87	14,19	-0,039	0,383	0,923
		-5,17	12,89	0,988	0,151	-0,021
H1 (DFT)	-54,59	31,33	-23,26	0,880	0,447	0,160
		1,14	-53,45	-0,348	0,378	0,858
		-32,47	-87,06	-0,323	0,811	-0,488
H(N) (DFT)	-4,34	7,93	3,59	0,968	0,148	0,201
		-3,23	-7,57	-0,218	0,893	0,394
		-4,70	-9,04	-0,121	-0,425	0,897
N (DFT)	-4,44	5,70	1,26	-0,320	0,485	0,814
		-2,40	-6,84	-0,555	0,601	-0,576
		-3,30	-7,74	0,768	0,636	-0,077



Figur 5.10: Positiv isospinntettleiksfordeling for det dekarboksylerte kationet i N-acetyl-L-tyrosin, føreslått danna etter bestråling ved 77 K. Spinntettleiksfordelingane er henta ut frå DFT-berekningane og figuren viser spinntettleiksfordelingane ved ein konturverdi på 0,001811 a. u..

Kopling IV+ i tabell 5.1 og DFT-tensoren H1 i tabell 5.2, viser og eit godt samsvar både i isotrope og anisotrope verdiar. Avviket mellom t_{\min}^{α} -, t_{int}^{α} - og t_{maks}^{α} -vektorene for dei to koplingane er høvesvis 4,7°, 1,0° og 4,6°.

DFT-berekningane går ut frå at metylgruppa ikkje roterer og estimerar tensorar til dei tre metylprotona ut frå dette. Etter optimalisering hadde H(11-1) og H(11-3) dihedralkvinklar på rundt 30° til $2p_z$ -orbitalet på C10. Metylprotonet H(11-2) vart liggande i planet utspent av C11-C10-N, med andre ord med ein dihedralkvinkel på nær 90° til $2p_z$ -orbitalet på C10. Dersom metylgruppa roterer vil ein frå DFT-berekningane kunne forvente ein isotropverdi på rundt 8,3 MHz (som er snittet av isotropverdiar til H(11-1), H(11-2) og H(11-3) i tabell 5.2) for koplinga til metylgruppa. Samanlikna med den eksperimentelle isotropverdien på 16 MHz for kopling I±, synast koplinga til metylgruppa å verte underestimert i DFT-berekningane.

Oppsummert har DFT-berekningane av det dekarboksylerte kationet eit godt samsvar med dei eksperimentelle data for radikal B, og berekningane støttar slik opp under denne modellen for radikal B.

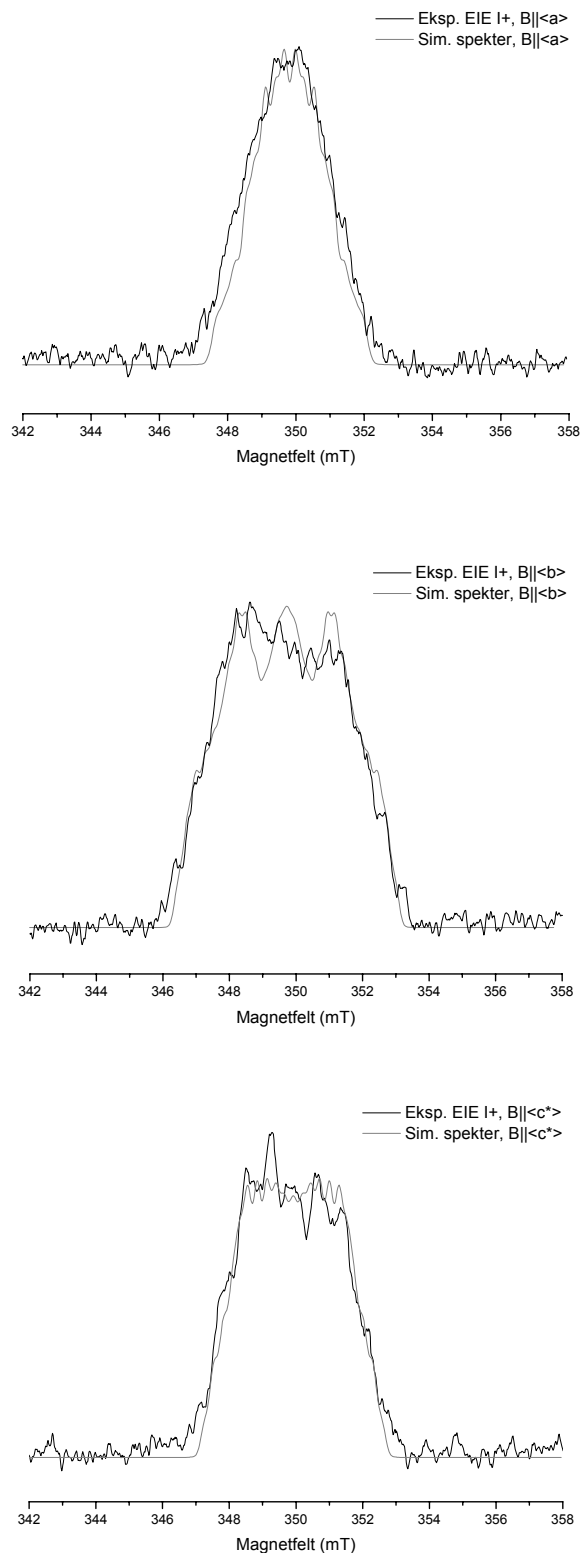
5.3.4 Simuleringar radikal B

Ved hjelp av simuleringsprogrammet KVASAT (Lund *et. al.*, 1978; Sagstuen *et al.*, 2000) er det mogleg å simulere EPR-absorpsjonsspekter på bakgrunn av gjevne prinsipalverdiar og eigenvektorar. Figur 5.11 viser EIE-spektra for linje I+ med magnetfeltet parallelt med dei tre ortogonale referanseaksane $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c^* \rangle$ (svarte spekter). Dei grå spektra er simulerte EPR-absorpsjonsspektre med utgangspunkt i tensorane frå tabell 5.1 og tensor H(N) og N frå tabell 5.2. Samsvaret mellom dei eksperimentelle og dei simulerte spektra er godt, men dei simulerte spektra ser ut til å ha noko mindre breidde enn dei eksperimentelle EIE-spektra. Oppsplittinga er heller ikkje heilt lik i dei simulerte og dei eksperimentelle spektra, men dette er ikkje å forvente sidan dei eksperimentelle spektra er så lite oppløyste som dei er.

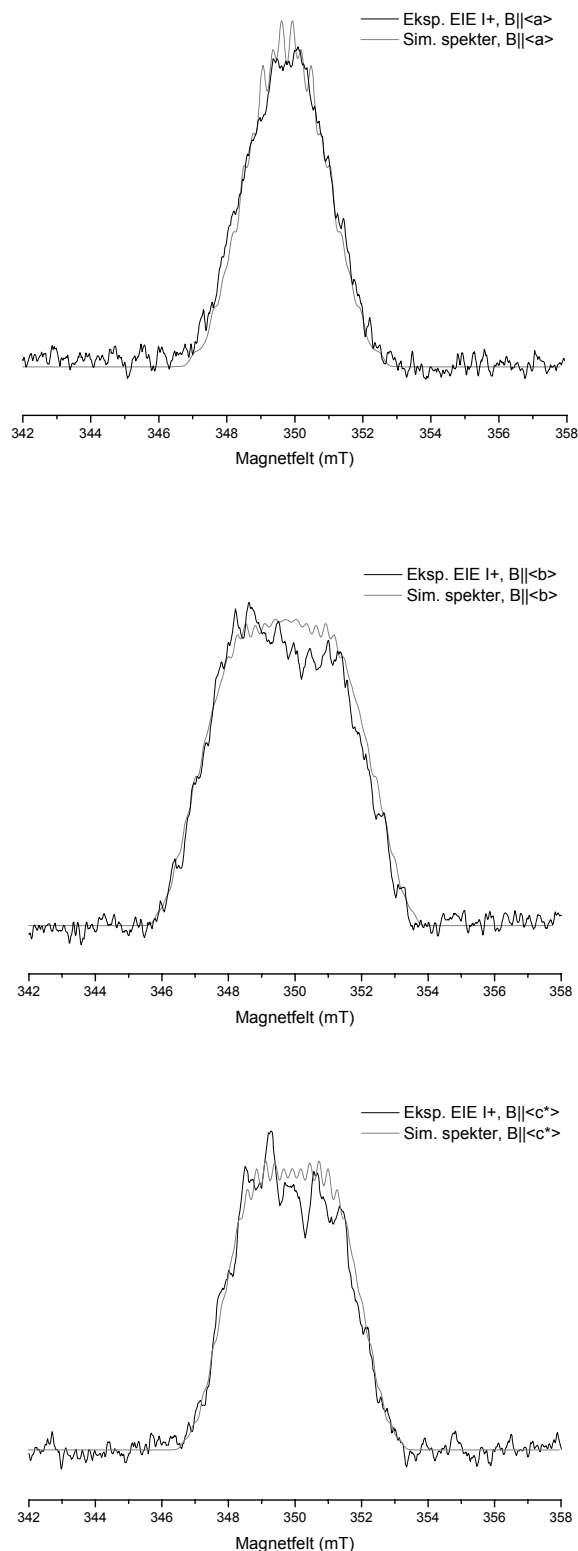
Dersom ein går ut frå at kopling I_{\pm} er knytt til ei roterande metylgruppe vil koplinga gje eit bidrag til breidda i EPR- og EIE-spektra som forventast å vere tre gongar verdien av den observerte koplinga. Figur 5.12 viser dei same eksperimentelle EIE-spektra som figur 5.11, men i simuleringane er kopling I_{\pm} lagt inn som tre like koplingar (som forventa for koplingar til ei roterande metylgruppe). Dette fører naturlegvis til at dei simulerte spektra vert noko breiare enn i figur 5.11. Samsvaret mellom breidda til dei eksperimentelle EIE-spektra og breidda til dei simulerte spektra ser ut til å vere noko betre i figur 5.12 enn i figur 5.11 og dette støttar opp under analysane i kapittel 5.3.2, som konkluderte med at metylgruppa roterer i dekarboksyleringsproduktet, radikal B.

I figur 5.13 er det eksperimentelle EPR-spekteret, teke opp med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen ved 77 K, plotta saman med eit samla simulert 1.derivert absorpsjonsspekteret for radikal A (tyrosylradikalet ved 77 K) og radikal B (det dekarboksylerede kationet). Radikala er vekta likt i simuleringane. Samanliknar ein dei simulerte EPR-spektra i figur 5.3 (radikal A) og i figur 5.13 (radikal A og B), vert det tydeleg at radikal B gjev eit breiare bidrag i EPR-spekteret enn radikal A. Samla sett er samsvaret mellom det simulerte og det eksperimentelle spekteret i figur 5.13 svært bra, men spesielt på flankane er det forskjellar. Flankeresonansane i det eksperimentelle EPR-spekteret vart i kapittel 5.1 og 5.2 knytt til radikal C og dette radikalet er ikkje med i simuleringa. Dei forskjellane som observerast mellom det eksperimentelle og det simulerte spekteret kan difor truleg tilskrивast radikal C.

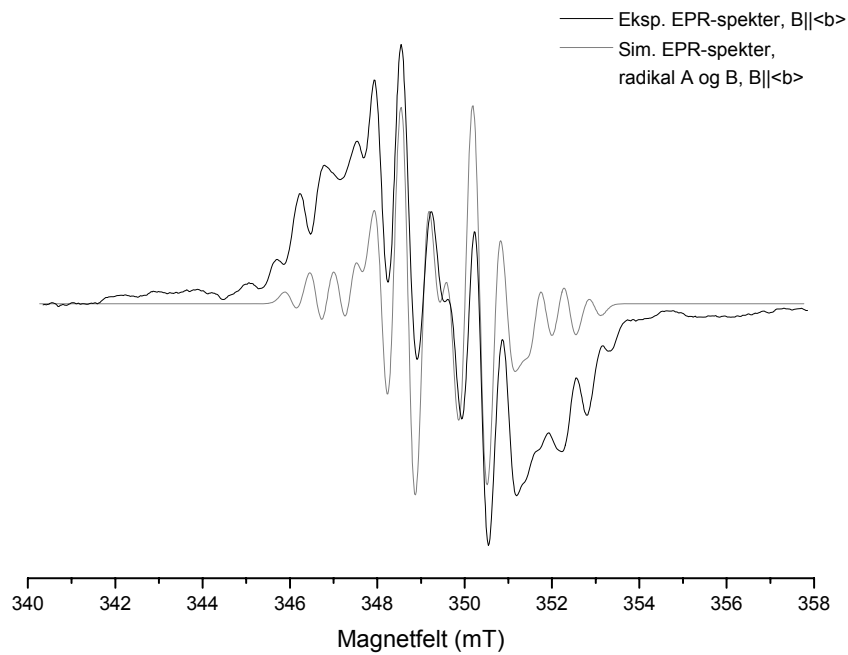
I kapittel 6 vert dannelsesmekanismane for det dekarboksylerede N-acetyl-L-tyrosin-radikalet drøfta (figur 6.3) og radikalet vert sett i samanheng med dei andre radikala funne i dette arbeidet (figur 6.5).



Figur 5.11: Eksperimentelt EIE-spekter for kopling I⁺ (svart spekter) og simulert EPR-absorpsjonsspekter (grått spekter) for radikal B i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 77 K. For simuleringane er tensorane i tabell 5.1 i tillegg til kopling H(N) og N frå tabell 5.2, nytta som input. Magnetfeltet er i det øvste spekteret retta langs <a>-aksen, i det midtre spekteret langs -aksen og i det nedste spekteret langs <c*>-aksen.



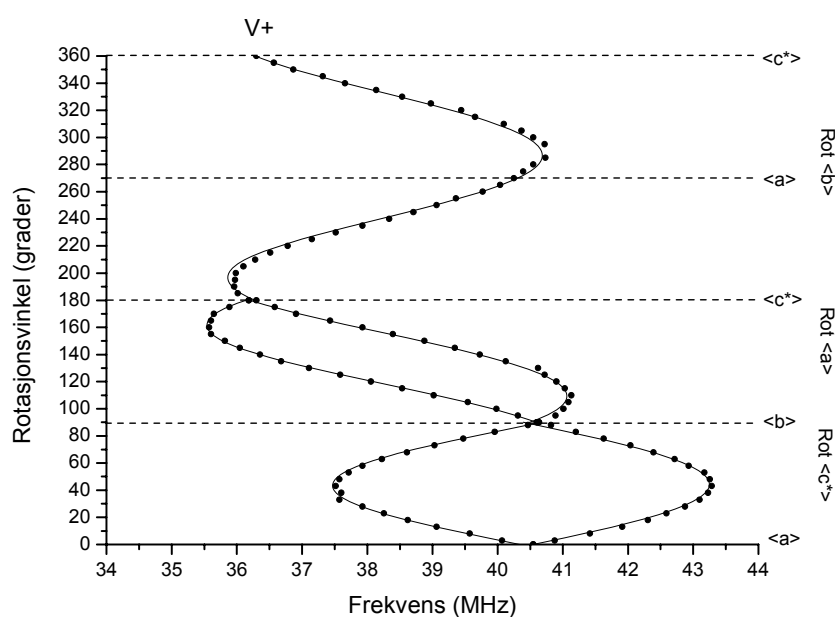
Figur 5.12: Eksperimentelt EIE-spekter for kopling I+ (svart spekter) og simulert EPR-absorpsjonskurve (grått spekter) for radikal B i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 77 K. Input for simuleringane er tensorane i tabell 5.1 i tillegg til tensorane H(N) og N frå tabell 5.2. Det er gått ut frå at kopling I stammar frå ei roterande metylgruppe og denne er difor lagt inn som tre like koplingar i simuleringane. Magnetfeltet er i det øvste spekteret retta langs <a>-aksen, i det midtre spekteret langs -aksen og i det nedste spekteret langs <c*>-aksen.



Figur 5.13: Det svarte spekteret i figuren er det eksperimentelle 1.deriverte EPR-signalet teke opp med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen for ein ikkje-deutreret N-acetyl-L-tyrosin-krystall bestrålt og målt ved 77 K. Det grå spekteret er det simulerte 1.deriverte absorpsjonsspekteret med utgangspunkt i tensorane til radikal A og B (sjå figur 4.11 og figur 5.12). Radikala er vekta likt i simuleringa.

5.4 Radikal C

Kopling V+ og X+ har i tidlegare analyser vorte sorterte til radikal C. Berre kopling V+ let seg følge i tre rotasjonsplan og i figur 5.14 er frekvensvariasjonen for kopling V+ plotta som funksjon av rotasjonsvinkel. Ved hjelp av MAGRES (Nelson og Gill, 1978; Nelson, 1980) vart tensoren til kopling V+ berekna, sjå tabell 5.3. Som vanleg gav MAGRES (Nelson og Gill, 1978; Nelson, 1980) to variantar av tensoren. Begge Schonlandvariantane hadde prinsipalverdiar som syntes å vere på β -form og det var små skilnader mellom retningane til dei største prinsipalverdiane for dei to variantane. Tabell 5.3 viser varianten med ”best” aksialsymmetri. Den heiltrekte kurva i figur 5.14 er berekna frå tensordata i tabell 5.3.



Figur 5.14: Observerte endringar i ENDOR-resonansfrekvensar som funksjon av rotasjonsvinkel for kopling V+ knytt til radikal C observert i ikkje-deuterte krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte og målte ved 77 K. Den heiltrekte kurva viser frekvensvariasjonar berekna med tensoren i tabell 5.3 som utgangspunkt.

Tabell 5.3: Hyperfinkoplingstensor for kopling V+ knytt til **radikal C** observert i ikkje-deuterte krystallar av N-acetyl-L-tyrosin, bestrålte og målte ved om lag 77 K. Tala i parentes representerer standardavviket til det siste talet i den lista verdien.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c>
V+	48,14 (1)	9,76 (2)	57,90 (2)	0,663 (1)	0,698 (1)	-0,269 (2)
		-2,91 (2)	45,23 (2)	0,745 (1)	-0,651 (1)	0,145 (2)
		-6,86 (2)	41,28 (2)	0,074 (1)	0,297 (3)	0,952 (1)

5.4.1 Analyse av kopling, radikal C

Som nemnt over synast kopling V+ å ha form som ei β -kopling, men koplinga har noko større anisotropi enn det som er vanleg for regulære β -koplingar knytt til C_α - C_β - H_β -fragment. β -koplingar som er knytt til C_α - O_β - H_β -fragment er derimot kjenneteikna av større anisotropi sidan C_α - H_β -avstanden normalt er kortare i eit C_α - O_β - H_β -fragment enn i eit C_α - C_β - H_β -fragment (Lund og Shiotani, 1991). Analysen av ENDOR-spektra frå deutrerete krystallar i kapittel 5.2, gav visse indikasjonar på at kopling V+ kunne vere knytt til eit proton som let seg byte ut med deuterium i tungtvatn og dette er normalt tilfelle for proton bundne til oksygenatom.

Vektoren t_{maks}^β har vorte samanlikna med moglege C_α - H_β -retningar i ein uskada N-acetyl-L-tyrosin-struktur for å sannsynleggjere kvar i molekylet vekselverknadane som gjev opphav til kopling V+ finn stad. I ein uskada molekylstruktur er det to potensielle β -koplingar til proton bundne til oksygen; H(O2) og H(O3), sjå t.d. figur 3.1 b). Men retningane C2-H(O2) og C7-H(O3) avviker begge med over 60° i forhold til t_{maks}^β til kopling V+. Den C_α - H_β -retninga som synast å ligge nærmast t_{maks}^β er bindingsretninga C10-H(N), med eit avvik på $10,8^\circ$.

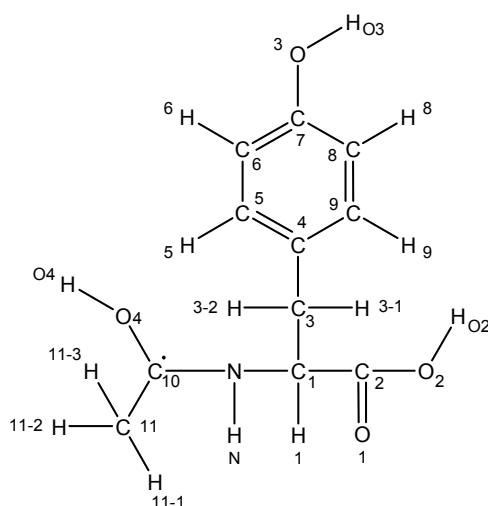
EIE-spekteret til kopling X+ knytt til radikal C viser ein sjulinja struktur med ei halvverdibreidde på rundt 10,6 mT, sjå figur 5.6. Dei sju EIE-resonanslinjene er splitta med 1,6-1,7 mT som svarer til 44-48 MHz. EPR-spekteret med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen nedst i figur 5.1, har to resonanslinjer på venstre flanke ved om lag 344,4 og 346,0 mT og to resonanslinjer på høgre flanke ved 353,4 og 355,0 mT. Desse resonanslinjene er separerte med 1,6 mT som svarer til splittinga målt i EIE-spekteret til kopling X+. Ei hyperfinsplitting på 44 MHz gjev frå likning 3.39 ENDOR-resonansfrekvensar ved om lag 7,2 og 36,8 MHz. I ENDOR-spekteret med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen er resonansfrekvensen til kopling V+ målt til 36,2 MHz. Det er med andre ord samsvar mellom splittingane i EPR- og EIE-spektra og splittingskonstanten til kopling V+.

5.4.2 Kandidat til radikal C: Protonert karbonylanion

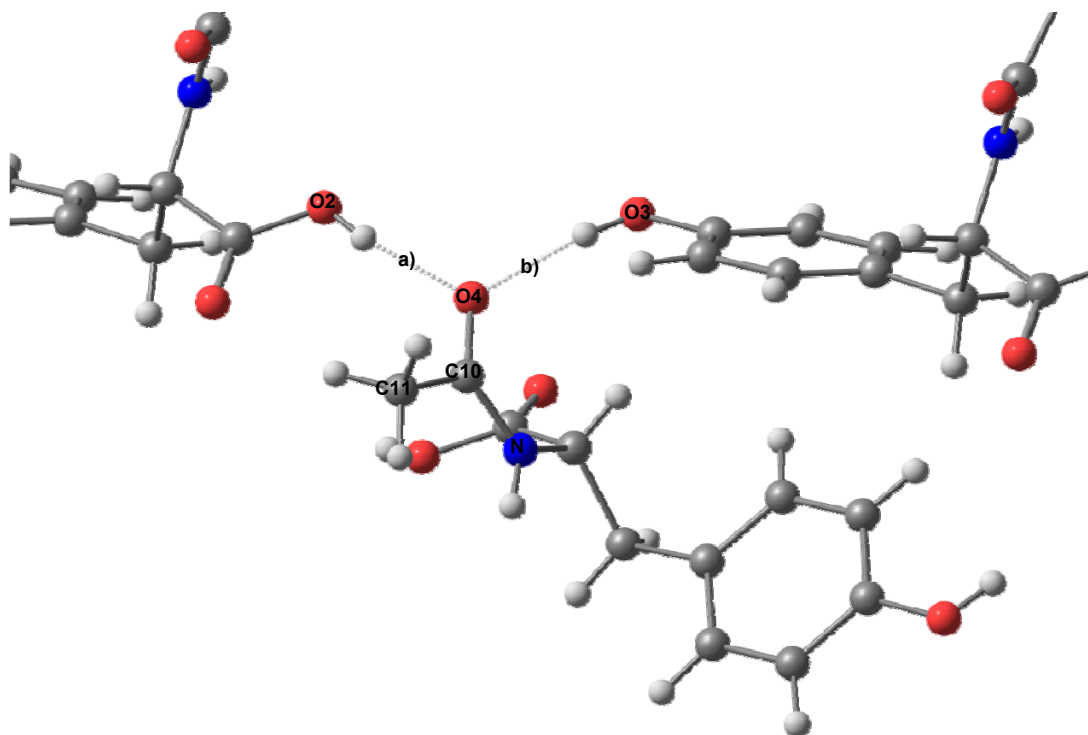
Dersom ein tek utgangspunkt i at kopling V+ er knytt til eit C_α - O_β - H_β -fragment, er talet på moglege radikalkandidatar i N-acetyl-L-tyrosin avgrensa. Så fram det ikkje skjer store reorganiseringar kan ein gå ut frå at H(O2) og H(O3) ikkje er moglege kandidatar til kopling V+, på grunn av det dårlege samsvaret mellom t_{maks}^β og dei krystallografiske retningane C2-H(O2) og C7-H(O3) (sjå kapittel 5.4.1). Krystallstrukturen viser og at H(O3) berre er rundt 17° frå å ligge i same plan som den aromatiske ringen og at H(O2) om lag ligg i planet

utspent av O1, C2 og O2. Potensielle β -koplingar til desse protona vil difor truleg verte mykje mindre enn den eksperimentelt observerte koplinga V^+ . Som nemnt i kapittel 4.5.4 har oksygenatom normalt stor elektronaffinitet og kan gjerne fange inn elektron frå omgjevnadane og slik danne anionradikal. Anionet kan i neste omgang trekkje til seg H^+ og danne eit protonert anion. For radikal III ved romtemperatur var det protonerte karboksylanionet ein av dei potensielle modellane. Modellen hadde som utgangspunkt at det tilkommande protonet H(O1) vart liggande i planet utspent av O1, C2 og O2 og at β -koplingane til både H(O2) og H(O1) vart små, sjå figur 4.21. Det kan sjølvstyk tenkast at H(O1) slett ikkje vert liggande i planet utspent av O1, C2 og O2, men i staden stikk ut av planet slik at hyperkonjugasjonen mellom H(O1) og eit spinn på C2 vert større. Ein slik radikal-konfigurasjon vil kunne gje ei stor β -kopling til H(O1), i tillegg til ei mindre β -kopling til H1 og ei minimal kopling til H(O2). Men med tanke på at radikal C gjev sju linjer med ei halvverdibreidde på om lag 10,6 mT i EIE-spekteret med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen, vil det protonerte karboksylanionet med sine tre potensielle β -koplingar, ikkje kunne svare til radikal C.

I eit N-acetyl-L-tyrosin-molekyl vil det og kunne dannast eit anion ved at O4 fangar inn eit elektron. I eit slikt karbonylanion vil hovuddelen av spinnnet vere lokalisert til C10. Den negative overskotsladninga på O4 vil i neste omgang kunne trekkje til seg H^+ frå omgjevnadane slik at anionet vert protonert, sjå figur 5.15. I ein krystall av N-acetyl-L-tyrosin inngår O4 i hydrogenbindingar både med O3-H(O3) og O2-H(O2), som vist i figur 5.16. Ved protonering er det sannsynleg av O4 vil tiltrekkje seg H^+ gjennom ei av hydrogenbindingane. Dersom H(O4) ikkje vert utsett for coulombiske vekselverknadar, kan retninga til O4-H(O4) i det protonerte anionet vere om lag lik retninga til hydrogenbindinga. Ved å plassere hydrogenatomet H(O4) i dei to potensielle posisjonane a) og b) i figur 5.16 og ved å sette bindingslengdene i C10-O4-H(O4)-fragmentet lik lengdene forventa for slike bindingsfragment (i dette tilfellet er bindingslengdene sett lik lengdene i C2-O2-H(O2)-fragmentet), kan to moglege C10-H(O4)-retningar bereknast. Retninga C10-H(O4) med HO4 stabilisert i retninga definert av hydrogenbindinga til O3 (sjå b) i figur 5.16) gjev eit avvik på om lag 43° frå t_{maks}^β til kopling V^+ . Retninga C10-H(O4) der HO4 ligg i retninga definert av hydrogenbindinga til O2 (sjå a) i figur 5.16), gjev derimot eit mindre avvik på rundt 17° i forhold til t_{maks}^β til kopling V^+ . I denne posisjonen har H(O4) ein dihedralkvinkel på om lag 42° til retninga normalt på N-C10-O4-fragmentet.



Figur 5.15: Det protonerte karbonylanionet tenkt danna som ein sekundærprosess i eit N-acetyl-L-tyrosin-molekyl etter elektroninnfanging på O4. Radikalet er ein potensiell kandidat til radikal C observert i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 77 K.



Figur 5.16: I ein N-acetyl-L-tyrosin-krystall er O4 hydrogenbunde til a) O2 og b) O3 i andre omliggande molekul. Etter elektroninnfanging på O4 kan N-acetyl-L-tyrosin-anionet truleg tiltrekkje seg H^+ anten frå O2 eller O3 og karbonylanionet vert dermed protonert.

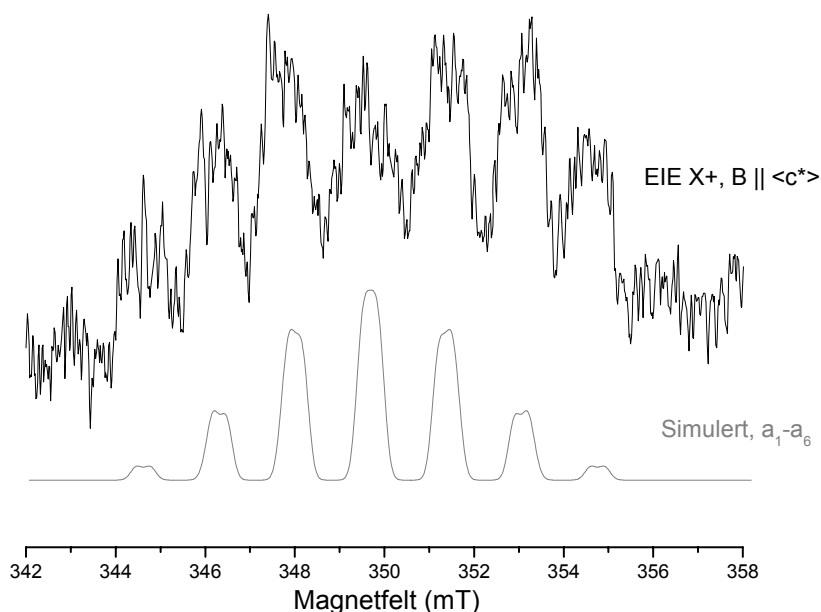
Eit anion som er protonert på O4-posisjon vil gje grunnlag for fleire koplingar. Spinntettleik på C10 vil som tidlegare nemnt, forvente å gje ei β -kopling til H(O4). Ein vil og kunne få ei β -kopling til H(N), men sidan H(N) frå krystallografiske data ligg om lag i same plan som N-C10-O4-fragmentet vil koplinga til dette protonet truleg verte svært lita, sjå figur 5.16. Peptidbindinga er ein plan struktur og ein del av spinnet på C10 kan difor delokalisrast over C10-N-bindinga og gje ei kopling til N. Spinntettleik på N kan og tenkast å gje ei lita β -kopling til H1. I tillegg til koplingane nemnt over, vil ein forvente kopling til metylgruppa. Denne koplinga vil avhenge av spinntettleiken på C10 og av rørsla til metylgruppa som skildra i avsnitt 5.3.2. Samla sett synast eit protonert karbonylanion å kunne gje mange og store nok koplingar til å forklare EIE-spektra i figur 5.6.

Ulike DFT-berekningar med ulik grad av optimalisering er gjort på det protonerte karbonylanionet. Det viste seg at storleiken på dei berekna koplingane til N, H(N) og H(O4) er svært avhengig av dei restriksjonane som vert sett på radikalet under berekningane og dei DFT-berekna tensorane er difor ikkje i sin heilskap viste her. Koplingane til metylgruppa synast å variere mindre i dei ulike berekningane og snittet av dei tre metylkoplingane var om lag 58 MHz som svarer til 2,1 mT. I kapittel 5.4.1 vart splittingane mellom dei sju resonanslinjene i EIE-spekteret for kopling X+ langs $\langle c^* \rangle$ -aksen målt til 1,6-1,7 mT og det synast rimeleg at desse splittingane delvis kan skuldast koplingar til metylgruppa i eit protonert karbonylanion. Dersom ein går ut frå at metylgruppa i snitt gjev ei kopling på 1,7 mT vert spinntettleiken på C10 tilnærma lik 0,59, etter formelen $a_{iso}^{\beta, methyl} = B \cdot \rho^\pi$ med $B \approx 2,9$ mT (Fessenden og Schuler, 1963b). Med denne spinntettleiken, isotropverdien til kopling V+, $B_0 \approx 0$ MHz og $B_I \approx 126$ MHz innsett i likning 2.33, vert dihedralkvinkelen til H(O4) 36° . Denne dihedralkvinkelen er i rimeleg samsvar med dihedralkvinkelen på 42° for H(O4) stabilisert i retninga definert av hydrogenbindinga til O2 (sjå figur 5.16 a)).

I ENDOR-spekteret teke opp med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen er splittinga til kopling V+ på 1,57 mT. Med denne splittinga for kopling V+ og tre potensielle splittingar på rundt 1,7 mT frå metylgruppa, vil ein forvente eit femlinja EPR-/EIE-spekter med total breidde på om lag 6,7 mT. Samanlikna med det eksperimentelle sjulinja EIE-spekteret langs $\langle c^* \rangle$ -aksen med ei total breidde på om lag 10,6 mT, peikar dette i retning av ytterligare ei eller fleire koplingar som langs $\langle c^* \rangle$ -aksen totalt gjev eit bidrag på ca. 3,9 mT til spekterbreidda. I radikalmodellen i figur 5.15 er det i hovudsak tre kandidatar til slike koplingar; N, H(N) og H1.

Figur 5.17 viser det eksperimentelle EIE-spekteret til kopling X+ ved $\langle c^* \rangle$ -aksen i tillegg til eit simulert spekter frå BJSIMPROG, som er eit program som baserar simuleringar på isotropisk første ordens teori for S=1/2, I=1/2 og I=1 system. Spekteret i figur 5.17 er simulert

med utgangspunkt i splittinga til kopling $V+$ på 1,57 mT langs $\langle c^* \rangle$ -aksen, tre like store protonkoplingar til metylgruppa på 1,7 mT, ei lita protonkopling på 0,3 mT (tiltenkt $H(N)$), i tillegg til ei nitrogen-sentralkopling på 1,7 mT. Som ein ser av figuren gjev desse koplingane eit simulert spekter som reproduserar dei grøvste trekka i det eksperimentelle EIE-spekteret knytt til radikal C. Dette er sjølvsagt berre ei av fleire moglegheiter, men figuren viser at radikalstrukturen i figur 4.15, under rette føresetnader, kan gje spekter som liknar dei eksperimentelt observerte spektra.



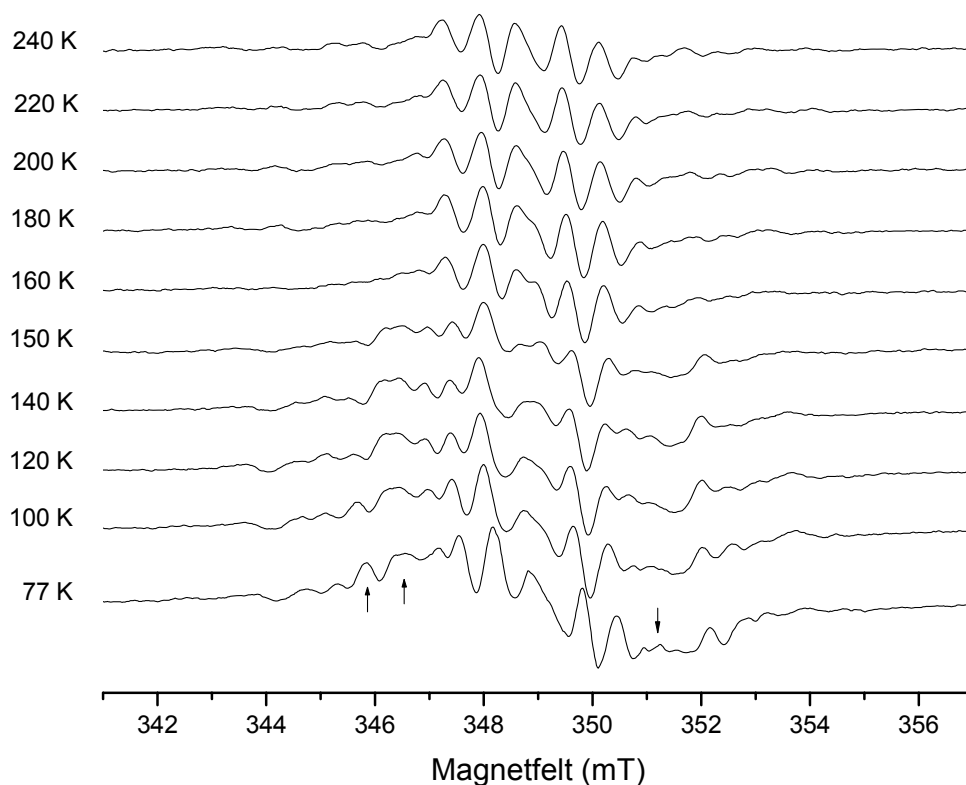
Figur 5.17: Det øvste (svarte) spekteret er EIE-signalet for kopling $X+$ teke opp med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen i ikkje-deuterte krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 77 K. Det nedste (grå) spekteret viser ei simulering (BJSIMPRO) av seks koplingar der fem av koplingane er protonkoplingar med splittingar på høvesvis $a_1=1,56$ mT, $a_2=a_3=a_4=1,7$ mT, $a_5=0,3$ mT og den siste koplinga er ei nitrogenkopling med splittingskonstant $a_6(N)=1,7$ mT.

Det er ikkje mogleg ut frå den eine observerte kopling $V+$ å fullt ut identifisere radikal C, men frå analysane i kapittel 5.4.1 og 5.4.2 synast det protonerte karbonylanionet å vere ein sannsynleg modell for radikalet. Andre potensielle modellar for radikal C må ha som utgangspunkt at det skjer store strukturmessige reorganiseringar som følgje av bestråling. Er dette tilfelle har ein ingen forutsetning for identifikasjon av radikal C, utan å kjenne fleire av koplingstensorane. Sjå oppsummering og vidare drøfting av radikal C i kapittel 6.

5.5 Resultat av oppvarmingsforsøk

Eksperimenta føreteke i denne oppgåva viser at ulike radikal vert stabilisert ved ulike temperaturar. Berre tyrosylradikalet har vorte identifisert både ved romtemperatur (radikal I) og ved 77 K (radikal A). Erfaring viser at stabiliteten til mange radikal er temperaturavhengig, så ved å varme opp ei prøve bestrålt ved låge temperaturar, kan ein ofte bestemme ved kva temperaturar ulike radikal rekombinerar eller vert omdanna til andre typar radikal.

Etter bestråling av ein ikkje-deutrerert N-acetyl-L-tyrosin-krystall ved 77 K vart temperaturen sakte heva i intervall på 10-20 K. EPR- og ENDOR-målingar vart føreteke for kvart steg medan temperaturen vart halden konstant den tida målingane tok. For å skilje mellom reversible og irreversible spekterendringar vart temperaturen regelmessig senka ned igjen til 77 K.



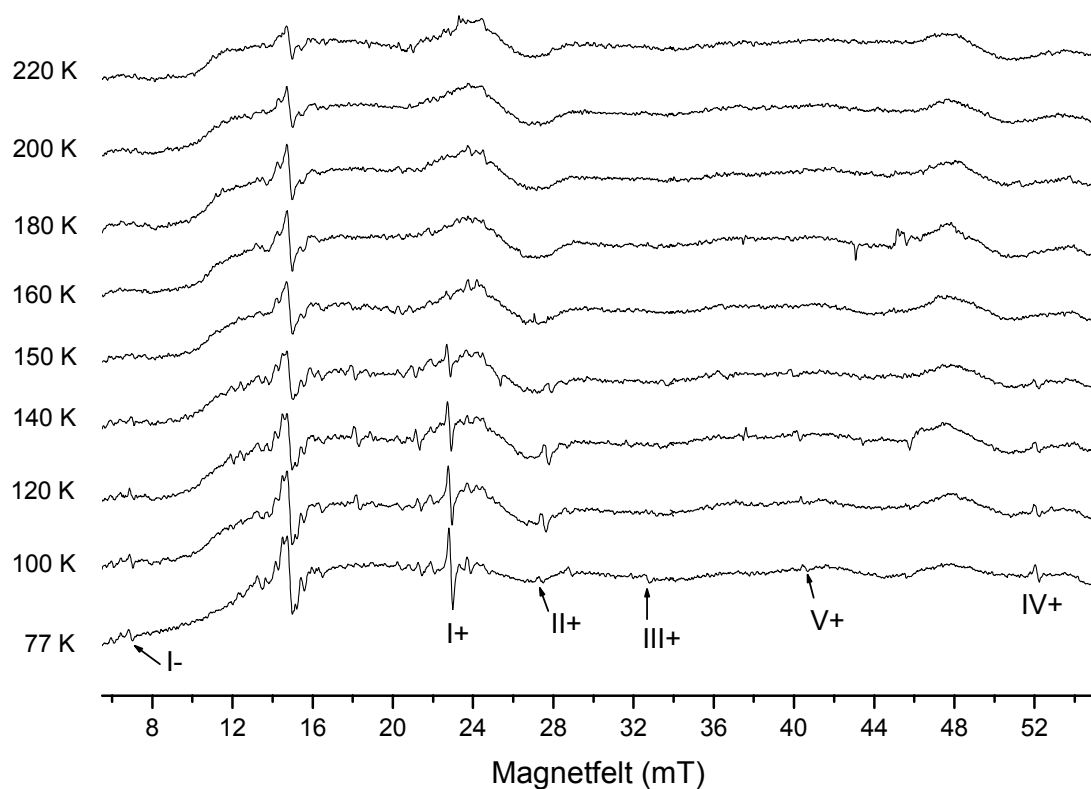
Figur 5.18: EPR-spekter frå ein ikkje-deutrerert N-acetyl-L-tyrosin-krystall bestrålt ved 77 K og deretter utsett for stegvis oppvarming til 240 K. Magnetfeltet er retta langs den krystallografiske $\langle b \rangle$ -aksen og mikrobølgefrequensen er 9,76818 GHz. Spektra er tekne opp ved dei viste temperaturane.

Figur 5.18 viser EPR-spektra teke opp ved dei ulike temperaturane med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen. Av figuren synast det som om resonanslinjene i senteret av EPR-spektra

gradvis vert mindre oppsplitta etter som temperaturen aukar. I avsnitt 5.1.1 vart dei fem/seks resonanslinjene i senteret av $\langle b \rangle$ -aksespekteret ved 77 K tilskrivne tyrosylradikalet (radikal A). I figur 5.18 ser intensitetsforholdet til desse fem/seks linjene ut til å gå frå eit tilnærma 1:2:1:1:2:1-intensitetsforhold ved 77 K til eit tilnærma 1:2:2:2:1-intensitetsforhold ved høgare temperaturar. I EPR-spektra tekne opp ved temperaturar over 180 K er sentra i spektra nær identisk til senteret i EPR-spekteret ved romtemperatur (sjå t.d. figur 4.1). Desse observasjonane støttar dermed hypotesen i kapittel 5.1.1, der tyrosylradikalet vart føreslått danna allereie ved låge temperaturar (radikal A) og dei observerte forskjellane mellom tyrosylradikalet ved 295 K (radikal I) og tyrosylradikalet ved 77 K (radikal B) vart gått ut frå å skuldast små endringar i radikalstruktur som følgje av temperatureffektar.

EPR-resonanslinjene som er markerte med piler i figur 5.18, ser ut til å forsvinne i temperaturintervallet 150-160 K. Dei simulerte 1.deriverte EPR-spektra av radikal A i figur 5.3 og av radikal A og B i figur 5.13, viser at desse resonanslinjene er knytte til radikal B. Temperaturen vart senka til 77 K og det kunne konstaterast at endringane var irreversible. Flankeresonansane, knytt til radikal C ved 77 K, er vanskelegare i følgje i EPR-spektra teke opp under oppvarming. Alle spektra i figur 5.18 synast å ha bidrag på flankane i spektra, men om desse bidraga er identiske til dei observerte flankeresonansane ved 77 K, er vanskeleg å avgjere sidan intensiteten til resonanslinjene er svært svak.

Det vart og teke opp ENDOR-spekter ved dei ulike temperaturane, og nokre av spektra er plotta i figur 5.19. Figuren viser at resonanslinjene I-IV, som alle er assosierte til dekarboksyleringsproduktet radikal B, forsvinn frå spektra i temperaturintervallet 140-160 K. Dette er i samsvar med endringane observerte i EPR-spektra i figur 5.18. ENDOR-resonanslinje V+, knytt til radikal C, er relativt svak i intensitet så det er vanskeleg å avgjere om denne resonanslinja forsvinn eller berre vert for svak til å kunne detekterast under oppvarming, sjå figur 5.19. Frå EPR-spektra i figur 5.18 kan ein observere svake resonanslinjer på flankane i spekteret ved 240 K men som nemnt over kan ein ikkje avgjere om desse flankeresonansane stammar frå radikal C eller frå eit anna radikal. Dersom radikal C er stabilt burde radikalet observerast i spektra frå romtemperaturbestrålte krystallar. Men frå romtemperaturresultata i kapittel 4, er radikal C ikkje observert. Flankeresonansane ved romtemperatur er derimot assosierte til radikal II, som ikkje har nokon likskapstrekk med radikal C ved 77 K. For vidare drøfting av samanhengen mellom romtemperaturradikal og lågtemperaturradikal, sjå kapittel 6.



Figur 5.19: ENDOR-spekter frå ein ikkje-deutrerert N-acetyl-L-tyrosin-krystall bestrålt ved 77 K og deretter utsett for stegvis oppvarming til 240 K. Magnetfeltet er retta langs den krystallografiske $\langle b \rangle$ -aksen og mikrobølgefrequensen er 9,7682 GHz. Spektra er tekne opp ved dei viste temperaturane.

6 Oppsummering og drøfting

I EPR/ENDOR/EIE-studiane av dipeptidet N-acetyl-L-tyrosin bestrålt ved 77 K og 295 K, har det vorte observert ulike radikal. I dette kapitlet vil resultata frå studiane verte samanfatta og moglege reaksjonsmekanismar som ligg til grunn for danninga av dei ulike radikala vil verte drøfta.

6.1 Romtemperaturreadikal

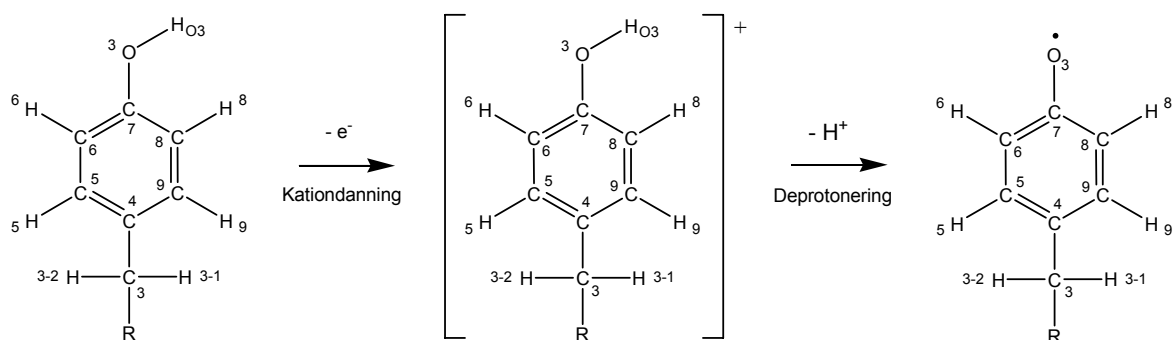
Bestråling av einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin ved romtemperatur produserer minst tre stabile radikal. Radikal I er mest sannsynleg eit tyrosylradikal, danna ved ein oksidasjon av OH-gruppa bunde til den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin. Resultata for dette radikalet vil verte oppsummert og drøfta i kapittel 6.1.1 For radikal II er to radikalkandidatar testa ut. Den eine kandidaten er eit radikal danna ved ein netto hydrogenaddisjon til den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin. Den andre kandidaten er eit oksidasjonsprodukt danna ved ein abstraksjon av det eine av dei to hydrogenatoma bunde til C3, sjå t.d. figur 3.1 b). I kapittel 6.1.2 vert dei ulike resultata og analysene av radikal II oppsummerte. Radikal III ved romtemperatur gjev opphav til ei enkelt kopling som truleg er ei β -type kopling. Også for dette radikalet er to radikalkandidatar drøfta. Den eine kandidaten er eit σ -radikal danna ved sokalla β -OH-eliminasjon av karboksylgruppa. Den andre kandidaten er eit protonert karboksylanion. Sjø oppsummering og vidare drøfting i kapittel 6.1.3.

6.1.1 Radikal I

På bakgrunn av EIE-spektra og andre analyser i kapittel 4.3 vart to α -koplingar, 1+ og 2+, sorterte til radikal I. Etter samanlikning mellom eigenvektorar og krystallografiske retningar vart kopling 1+ knytt til proton H6, kopling 2+ til proton H8 og radikal I vart føreslått å vere eit tyrosylradikal. Frå dei eksperimentelle tensorane 1+ og 2+ vart spinntettleikane på dei sentrale karbonatoma berekna og desse spinntettleikane stemte overeins med teoretisk berekna spinntettleikar på C6 og C8 i tyrosylradikalet, både frå SCF-teori (Fasanella og Gordy, 1969) og frå DFT-berekningar (sjå kapittel 4.3.3). DFT-berekningane på tyrosylradikalet gjev og hyperfinkoplingstensorar til H6 og H8 som både i storleik og retning har eit godt samsvar med dei eksperimentelle hyperfinkoplingstensorane 1+ og 2+. Hyperfinkoplingstensen til H(3-1) har det ikkje lukkast å bestemme eksperimentelt, men koplinga er t.d. observert i EPR-spekteret teke opp med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen,

sjå figur 4.2. I kapittel 4.3.4 vart resonansen for det føreslåtte tyrosylradikalet simulert med utgangspunkt i dei eksperimentelle tensorane frå tabell 4.1, i tillegg til DFT-berekna tensorar frå tabell 4.2. Dei simulerte spektra har eit godt samsvar med både dei eksperimentelle EIE- og EPR-spektra, sjå figur 4.10-4.11. På bakgrunn av alle desse resultata og analysane synast det som ein rimeleg konklusjon at radikal I er eit tyrosylradikal.

Figur 6.1 skisserer ein mogleg dannelsesprosess for tyrosylradikalet i N-acetyl-L-tyrosin. Ved bestråling tenker ein seg at N-acetyl-L-tyrosin vert oksidert (kationdanning). I ei etterfølgjande deprotonering abstraherast H^+ frå OH-gruppa i den aromatiske ringen og ein får danna tyrosylradikalet med eit upara spinn lokalisert til O3. I tyrosylradikalet vil spinnnet vere delokalisert over den aromatiske ringen og truleg fordele seg etter mønsteret vist i figur 4.8 og 4.9. Tyrosylradikalet er og observert ved låge temperaturar, sjå kapittel 6.2.



Figur 6.1: Modell for danning av tyrosylradikalet observert ved romtemperatur (radikal I) og 77 K (radikal A). Ved bestråling går ein ut frå at eit N-acetyl-L-tyrosin-molekyl kan verte oksidert. Kationradikalet kan ved deprotonering, omdannast til tyrosylradikalet. R markerer karboksylgruppa, peptidbindinga og acetylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin-molekylet, sjå til dømes figur 3.1 b).

6.1.2 Radikal II

Radikal II gjev ved romtemperatur ei breidde på om lag 6,3 mT i EIE-spektra teke opp med magnetfeltet retta langs $\langle c^* \rangle$ -aksen. Fire eksperimentelle koplingar er knytte til radikal II, men det er haldepunkt (som breidda på EIE-spekteret samanlikna med summen av hyperfinsplittings langs bestemte orienteringar) for at ei eller fleire uobserverte koplingar tilhøyrer radikalet.

Tre av koplingane (3-5 i tabell 4.4) er analyserte som α -koplingar. Den fjerde koplinga (6+ i tabell 4.4), er ei stor β -kopling på rundt 79 MHz. Samanlikning av krystallografiske retningar og retningane til koplingane gav haldepunkt for at kopling 3-5 stammar frå vekselverknadar i

eller nær den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin. Med dette som utgangspunkt vart to ulike modellar testa ut.

H-addisjonsradikal

På bakgrunn av retningane til koplingane 3-5 er ein potensiell radikalmodell for radikal II i N-acetyl-L-tyrosin hydrogenaddisjonsradikalet danna ved ein netto H-addisjon til C6. Ein slik H-addisjon kan truleg skje som ein sekundærreaksjon etter ein reduksjonsprosess i N-acetyl-L-tyrosin. Koplingane 3 og 5 er i så fall α -koplingar til høvesvis protona H5 og H9, medan kopling 4 må vere ei allyl-liknande kopling til proton H8, sjå figur 4.13. β -koplinga 6+ er tenkt knytt til proton H6'. Liknande radikal danna ved ein netto hydrogenaddisjon til aromatiske ringar er velkjente strålingsprodukt frå litteraturen (Fessenden og Schuler, 1962; Böhme og Wolf, 1972; Theisen og Sagstuen, 1981) og slike produkt dannar radikal med karakteristiske spinntettleiksfordelingar over den aromatiske ringen, sjå figur 4.14.

Dei første analysane i kapittel 4.4.2 viste at samsvaret mellom dei eksperimentelle retningane for koplingane knytte til radikal II samla sett ikkje samsvarte med dei forventa krystallografiske retningane for radikalet danna ved H-addisjon til C6, sjå tabell 4.5. Spesielt var avviket mellom retningane til kopling 4 og dei forventa retningane til allylkoplinga H8, unormalt stort. Berekningar viste og at med kopling 6+ knytt til H6' vart β -koplinga til H6'' for stor til å kunne tilskrивast radikal II. I tillegg gav dei eksperimentelle koplingane til radikal II spinntettleikar med vesentleg avvik frå spinntettleikar observert i liknande system frå litteraturen (figur 4.14).

I kapittel 4.4.3 vart det gjort DFT-berekningar på ulike H-addisjonsradikal ved å addere proton til ulike posisjonar i den aromatiske ringen. Alle DFT-berekningane gav spinntettleikar over den aromatiske ringen som var i samsvar med spinntettleikane i radikala frå litteraturen, men ikkje med dei eksperimentelt baserte spinntettleikane for koplingane 3-5.

Mezetti *et al.* (1999) har i sine studier på romtemperaturbestrålte N-acetyl-L-tyrosin-krystallar føreslått H-addisjonsradikalet for tensorar som tilsvarar tensorane knytt til radikal II i dette studiet. Frå analysen og drøftingane i kapittel 4.4.2-4.4.3 i denne oppgåva meiner vi å ha klare haldepunkt for at H-addisjonsradikalet ikkje tilsvarar radikal II observert i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin ved romtemperatur og vi har difor gått bort frå dette radikalet som modell for radikal II.

C3-oksidasjonsradikalet

Ein annan potensiell modell for radikal II i N-acetyl-L-tyrosin-krystallar bestrålte ved romtemperatur, er radikalet danna ved ein netto abstraksjon av H(3-1)/H(3-2), vist figur 4.15. I eit slikt radikal vil størsteparten av spinnnet vere lokalisert til C3, men avhengig av vinkelen mellom $2p_z$ -orbitalet på C3 og planet utspent av den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin, vil delar av spinnnet kunne delokaliserast over i den aromatiske ringen. For radikal II går ein ut frå at kopling 3 og kopling 4 er α -koplingar til høvesvis H5 og H9 og at kopling 5 er ei α -kopling til det attendeverande protonet bunde til C3. Dei eksperimentelle retningane til koplingane 3-5 viser eit rimeleg samsvar med desse forventa krystallografiske retningane, sjå tabell 4.7.

I tillegg til koplingane 3-5 er β -koplinga 6+ knytt til radikal II. Dei to moglege β -protonkandidatane til kopling 6+ i eit radikal danna ved oksidasjon av C3, vil vere protona H1 og H(O3). I eit uskada N-acetyl-L-tyrosin-molekyl ligg desse protona i nær same plan som planet utspent av C1, C3 og H(3-1) og planet utspent av den aromatiske ringen respektivt. Den optimaliserte radikalstrukturen frå DFT viser berre mindre strukturelle endringar i forhold til krystallstrukturen og dei DFT-berekna β -koplingane til H1 og H(O3) vert som forventa små koplingar som ikkje samsvarer med den eksperimentelt observerte koplinga 6+.

Som nemnt i kapittel 4.4.5 kan det tenkast at det skjer strukturelle reorganiseringar i radikalet som skuldast rehybridiseringar eller coulombske vekselverknadar. Slike strukturendringar kan sjølvstendig leie til endringar både i storleiken og retningane til dei ulike koplingane. Frå analysane av kopling 3-5 veit ein at C3-H3 må vere om lag parallell med planet utspent av den aromatiske ringen sidan ein er avhengig av å få delokalisert spinn over i den aromatiske ringen som kan gje koplingar til H5 og H9. For at H1 skal oppleve eit større overlapp til det upara spinnnet i $2p_z$ -orbitalen på C3 må difor H1 og/eller C3 endre seg slik at H1 får ein mindre dihedralkvinkel i forhold til $2p_z$ -orbitalen på C3. Av figur 4.16 ser ein at dette må medføre relativt store rørsler av acetylgruppa og karboksylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin. Slike store reorganiseringar synast lite sannsynlege sidan både acetylgruppa og karboksylgruppa er stabiliserte i krystallgitteret gjennom hydrogenbindingar til andre molekyll i krystallen.

Konklusjonen av analysen og drøftingane rundt radikal II er at radikal II ikkje synast å vere verken eit radikal danna ved ein H-addisjon til den aromatiske ringen eller eit radikal danna ved oksidasjon av C3. Av dei to potensielle modellane samsvarer likevel sistnemnde best med dei eksperimentelle data for radikal II.

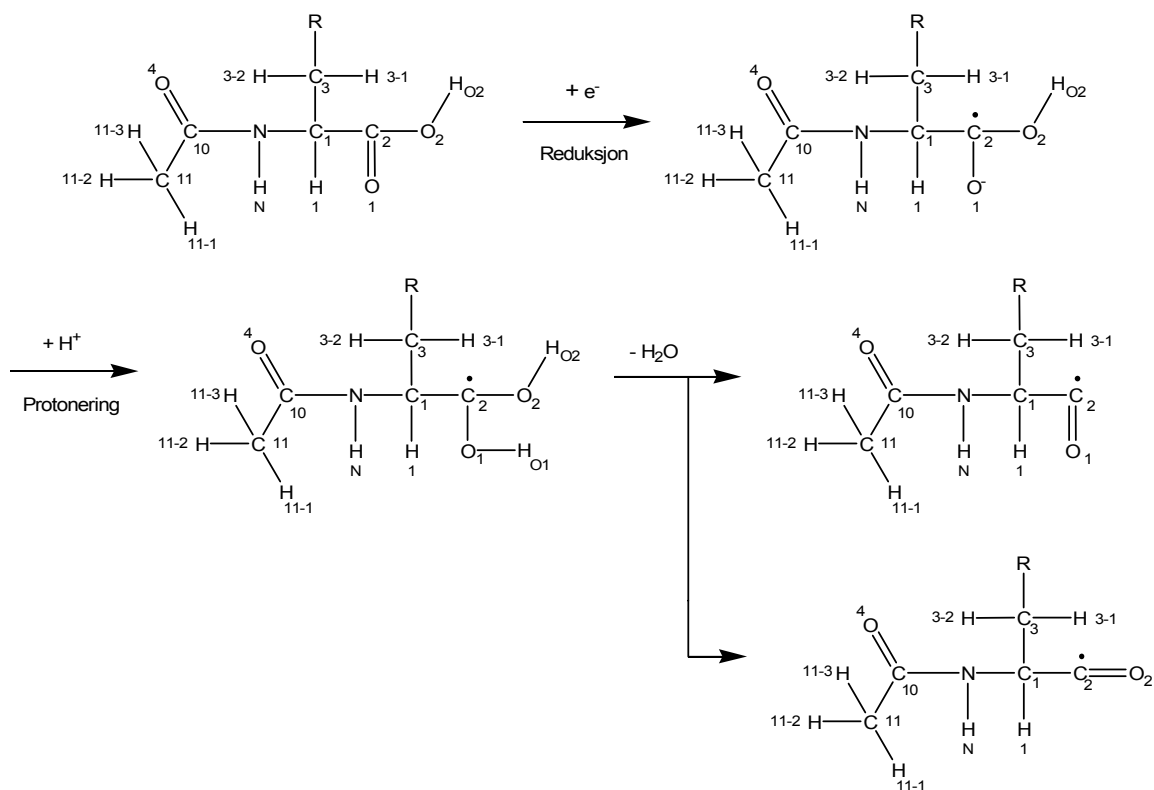
6.1.3 Radikal III

Radikal III er observert som ein dublett i EPR- og EIE-spektra ved romtemperatur og ei enkelt kopling ($8+$) er knytt til radikalet, sjå tabell 4.9. Analysen av denne koplinga viser at den har form som ei β -kopling med retninga til den største prinspalverdien nær den krystallografiske C2-H1-retninga. På bakgrunn av dette vart to ulike modellar testa ut, eit sokalla σ -radikal og eit protonert karboksylanion. Begge desse modellane er produkt etter reduksjonsprosessar i karboksylgruppa til N-acetyl-L-tyrosin, sjå figur 6.2 under. Ved innfangning av eit elektron på O1 vil ein få danna eit karboksylanion. Anionet kan vidare verte protonert ved å tiltrekkje seg H^+ frå omgjevnadane. I litteraturen er det dømer på at slike radikalprodukt kan danne sokalla σ -radikal, ved avspalting av H_2O (Box, 1977). σ -radikal vil ha størsteparten av det upara spinnet lokalisert i σ -orbital. Som vist i figur 6.2 er det to moglege variantar av eit slikt σ -radikal i N-acetyl-L-tyrosin, alt etter kva av oksygenatoma O1/O2 som vert tenkt spalta av. Begge σ -radikala i figur 6.2 har vorte testa som kandidatar til radikal III. Sidan det frå litteraturen ikkje er funne hyperfinkoplingstensorar for slike radikalprodukt er DFT nytta til å estimere storleiken på desse.

DFT-berekningane på dei to σ -radikala i kapittel 4.5.3 gav tensorar med tilnærma identiske eigenvektorar, sjå i tabell 4.10 a)-b). Isotropverdiane og dei anisotrope verdiane er derimot betydeleg ulike for dei to radikala. Det kan med andre ord sjå ut som om relativt små endringar i radikalstruktur gjev store endringar i isotrope og anisotrope verdier, men mindre endringar i eigenvektorar. Samanlikna med den eksperimentelle vektoren $8+$, gjev ingen av dei to DFT-berekna tensorane eit spesielt godt samsvar, verken i prinspalverdier eller i eigenverdier. Dersom ein skal gå ut frå DFT-berekningane synast difor ikkje nokon av σ -radikala skissert i figur 6.2, å samsvare radikal III.

Den andre potensielle radikalmodellen til radikal III, er det protonerte karboksylanionet, som er forløparen til σ -radikala drøfta over, sjå figur 6.2. På grunn av at det berre er knytt ei kopling til radikal III og at denne koplinga truleg er ei kopling til eit proton som ikkje let seg byte ut med deuterium, må koplingane til H(O1) og H(O2) vere små og uoppløyste. DFT-berekningane av denne modellen med H(O1) og H(O2) låst i planet utspent av O1-C2-O2, gav ein tensor til H1 som både i storleik og i retning har eit godt samsvar med den eksperimentelle koplinga $8+$. Men DFT-berekningane gjev og relativt store α -liknande koplingar til H(O1) og H(O2). Desse er ikkje observert eksperimentelt og breidda til EIE-spekteret til kopling $8+$ gjev ikkje rom for koplingar av denne storleiken. Det kan sjølvsagt vere at DFT overestimerar koplingane til H(O1) og H(O2) og at ein med rimeleg sannsyn kan konkludere med denne modellen for radikal III. Det som likevel talar i mot modellen er at studiar på ulike aminosyrer i litteraturen viser at liknande protonerte anion deaminerar ved

temperaturar under 160 K (Lund og Shiotani, 1991). Radikal III er derimot stabilt ved romtemperatur. Dette vil verte vidare drøfta i kapittel 6.3.



Figur 6.2: Modell for danning av eit protonert karboksylanion og σ -radikal i N-acetyl-L-tyrosin. Ved å gå ut frå ein reduksjonsprosess der eit elektron vert innfanga på O1 får ein danna eit karboksylanion (øvst til høgre). Karboksylanionet kan så verte protonert. Dette er den eine kandidaten til radikal III ved romtemperatur. Den andre kandidaten til radikal III, σ -radikalet, vert danna ved ein sokalla β -OH-eliminasjon av det protonerte karboksylanionet. Dette skjer ved avspaltning av H₂O og det upara spinnnet vil verte liggande i same plan som C₂=O-bindinga. Som vist i figuren over vil det vere to moglege slike produkt i N-acetyl-L-tyrosin. R markerer den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin.

6.2 Lågtemperaturreadikal

Når molekyl vert utsette for stråling vil dei primære stråleskadane i hovudsak vere danning av ion (kation og anion) etter innfangning eller utsparking av elektron. Alt etter grad av stabilitet vil desse primære radikala kunne nøytralisert ved protonerings-/deprotonerings-prosessar og/eller kunne gjennomgå sekundære prosessar. Ved romtemperatur observerar ein normalt berre dei stabile sluttprodukta etter ei rekke slike sekundærreaksjonar. Nedkjøling av systemet vil føre til at alle prosessar går saktare og det vil då vere mogleg å måle og eventuelt identifisere forløparane til romtemperaturreadikala.

I lågtemperaturstudiane (77 K) vart minst tre ulike radikal observerte i dei eksperimentelle spektra. Tyrosylradikalet som vart observert ved romtemperatur (radikal I) er og identifisert frå EPR- og EIE-spektra ved 77 K (radikal A), sjå figur 5.3 og figur 5.7. Radikalstrukturen endrar seg truleg noko med temperatur og forskjellane i dei sentrale resonanslinjene i EPR-spekteret med magnetfeltet retta langs $\langle b \rangle$ -aksen ved 295 K og 77 K kan med rimeleg visse tilskrivast slike temperatureffektar, sjå figur 5.3 og figur 5.18. Tyrosylradikalet er med andre ord relativt stabilt i temperaturområdet 77-295 K.

I tillegg til tyrosylradikalet (radikal A) er det frå EIE-spektra ved 77 K og andre analyser observert to andre lågtemperaturradikal. Radikal B er med rimeleg stor visse identifisert som eit dekarboksylert kation. I kapittel 6.2.1 vil resultata frå studiane på dette radikalet verte oppsummert og dannelsesmekanismane vil verte drøfta. Radikal C gjev eit EIE-spekter med ei total breidde på 10,5 mT, men det har berre lukkast å eksperimentelt bestemme ein tensor for dette radikalet. Den mest sannsynlege modellen for dette radikalet syntes å vere eit protonert karbonylanion og dette vert vidare drøfta i kapittel 6.2.2.

6.2.1 Radikal B

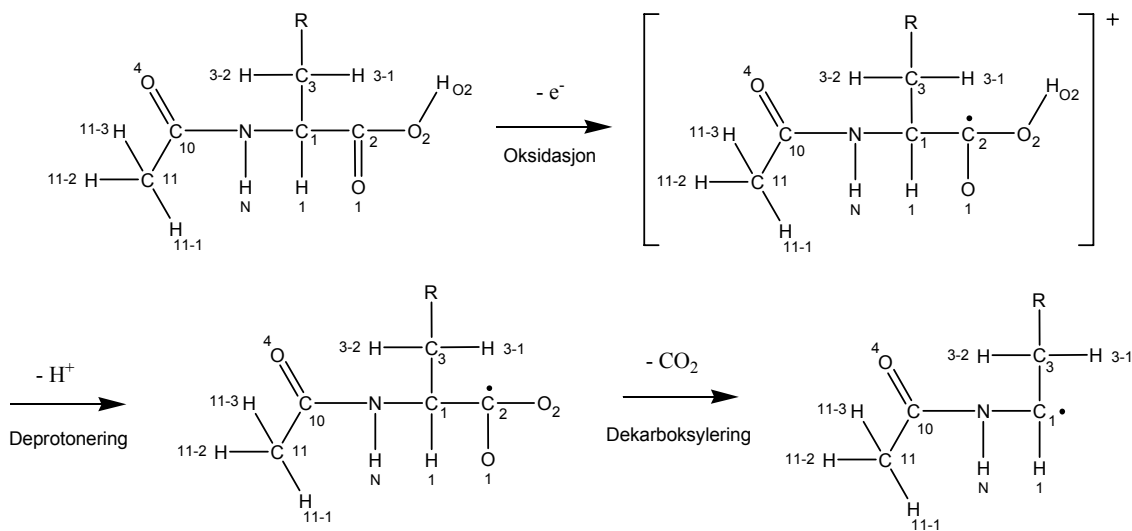
Etter analysen og drøftingane i kapittel 5.3 har radikal B vorte identifisert som eit dekarboksylert oksidasjonsprodukt. Med utgangspunkt i EIE-spektra har fire koplingar (I-IV i tabell 5.1) vorte knytte til radikal B (figur 5.5).

Av analysen i kapittel 5.3.1 er kopling I \pm identifisert som ei β -kopling med låg anisotropi og isotropverdi på rundt 16 MHz, koplingane II $^+$ og III $^+$ er identifiserte som to om lag ekvivalente regulære β -koplingar med isotropverdiar på høvesvis 24 og 28 MHz og kopling IV $^+$ er ei relativt stor α -kopling med isotropverdi på 54 MHz. Dei to β -koplingane II $^+$ og III $^+$ har, etter samanlikning med krystallografiske retningar, vorte knytte til metylenprotona H(3-1) og H(3-2). Det vil medføre at mesteparten av spinnnet må vere lokalisert på C1 og kopling IV er difor tenkt knytt til H1-protonet.

Ei slik spinnfordeling gjev grunnlag for to modellar, radikal danna ved brot i C1-N-bindinga (tilsvarer deaminering i aminosyrer) eller radikal danna ved brot i C1-C2-bindinga (dekarboksylering). Vi gjekk bort frå den førstnemnde modellen sidan modellen ikkje gav rom for β -koplinga I \pm . Den andre modellen viser eit godt samsvar med radikal B ved 77 K. Dersom ein går ut frå at C1 som følgje av bestråling går frå å vere sp^3 -hybridisert til å vere sp^2 -hybridisert, vil H1 ligge om lag i planet utspent av peptidbindinga. For denne konfigurasjonen stemmer retningane for både kopling II $^+$, III $^+$ og IV $^+$ med dei forventa retningane berekna frå dei krystallografiske data, sjå tabell 5.1. I tillegg gjev denne modellen

rom for at kopling I \pm kan knytast til vekselverknadar mellom upara spinn på C10 og metylgruppa, sjå kapittel 5.3.2. DFT-berekningane for dette radikalet gjev samla sett eit godt samsvar med det observerte radikal B. Simuleringane av radikal B er føretektne med dei eksperimentelle tensorane i tabell 5.1 i tillegg til DFT-berekna tensorar frå tabell 5.2. Det vart gjort to sett med simuleringar, eit sett der det vart gått ut frå at metylgruppa roterte og at kopling I \pm representerte snittet av vekselverknadane til metylgruppa (figur 5.12), og eit sett der det vart gått ut frå at metylgruppa var låst og kopling I \pm var ei kopling til eitt av metylprotona i den låste metylgruppa (figur 5.11). Det synest som om simuleringane med roterande metylgruppa gjev det beste samsvaret med breidda til dei eksperimentelle EIE-spektra. Desse observasjonane saman med det faktum at det berre er observert ei β -kopling med låg anisotropi som kan knytast til metylgruppa, gjer det sannsynleg at metylgruppa roterer i dekarboksyleringsproduktet.

Som tidlegare nemnt er dekarboksylerte oksidasjonsprodukt velkjente radikalprodukt frå litteraturen. Figur 6.3 skisserar mekanismane for danning av dekarboksyleringsproduktet i N-acetyl-L-tyrosin. Etter ein oksidasjon av karboksylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin kan ein få danna eit kation. Ved ei deprotonering med ei etterfølgjande avspalting av CO₂, sit ein att med det dekarboksylerte kationet*, førsått som modell for radikal B.



Figur 6.3: Modell for danning av eit dekarboksyleringsprodukt (radikal B) i N-acetyl-L-tyrosin. Etter ein oksidasjon og ei deprotonering av karboksylgruppa, tenker ein seg at CO₂ kan spaltast av og slik danne eit dekarboksylert radikalprodukt. R markerar den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin.

* Det endelege radikalproduktet i figur 6.3 har ikkje ei positiv overskotsladning og er difor ikkje eit kation. Når ein likevel kallar radikalet eit dekarboksylert kation viser ein i dette tilfelle til at ein av forløparane til radikalet er eit kation, ikkje at sjølve radikalet har ei positiv overskotsladning.

I studiar av både N-acetyl-glysin (Henriksen *et al.*, 1976), glycyl-glysin (Melø, 1975) og N-formylglysin (Sagstuen *et al.*, forventa publisert 2006) er dekarboksyleringsprodukta funne å vere stabile ved 77 K. Dei same studiane viser at under oppvarming vert dekarboksyleringsprodukta omdanna til andre radikal i temperaturintervallet 140-160 K. I både N-acetyl-glysin, glycyl-glysin og N-formylglysin er det dekarboksylerte kationet forløparen til "backbone"-radikal ved romtemperatur. Frå studiane på N-acetyl-L-tyrosin i denne oppgåva vart det dekarboksylerte kationet (radikal B) funne å vere stabilt ved 77 K og oppvarmingsforsøka viste at radikalet forsvann frå EPR- og ENDOR-spektra ved temperaturar på rundt 150 K. Om radikal B rekombinerar eller vert omdanna til eit anna radikalprodukt har det ikkje lukkast å avgjere, sjå vidare drøfting i kapittel 6.3.

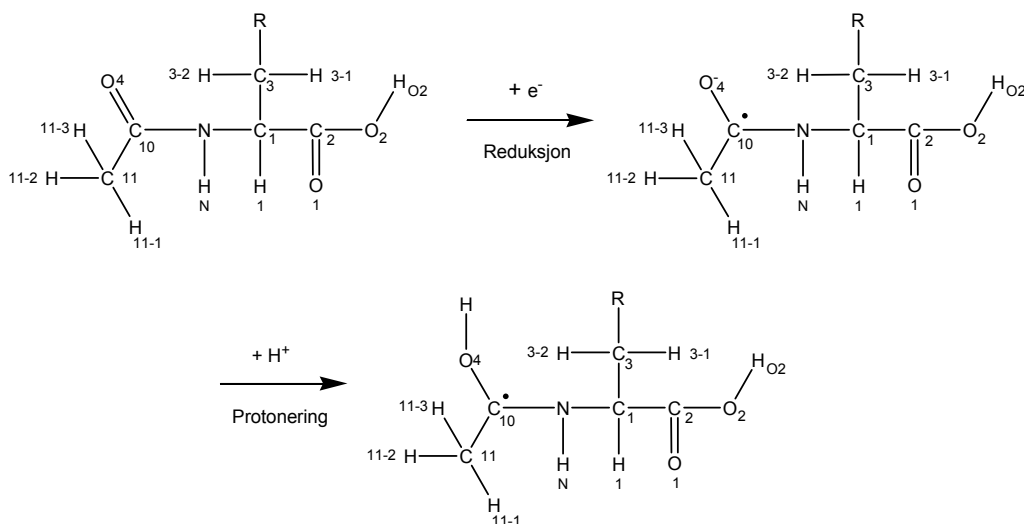
6.2.2 Radikal C

Radikal C gjev resonansar som dekkar heile EPR-spekteret ved 77 K og som med magnetfeltet retta langs c^* -aksen er om lag 10,5 mT breitt. Med berre ein observert hyperfinkoplingstensor (V^+) har identifiseringa av dette radikalet vorte vanskeleg. Men analysen av kopling V^+ gjer det sannsynleg at koplinga er ei β -kopling knytt til eit C_α - O_β - H_β -fragment, både på grunn av den store anisotropien til koplinga og at den truleg let seg byte ut med deuterium i tungtvatn. Eit av EIE-spektra knytt til radikal C viser ein struktur på sju resonanslinjer, noko som tyder at radikal C må ha bidrag frå fleire koplingar.

Med utgangspunkt i desse resultata og ved å gå ut frå at det ikkje har skjedd store strukturmessige endringar som følgje av bestråling, ser det ut til at det berre er eit alternativ til radikal C; det protonerte karbonylanionet. Denne modellen er den einaste som både gjev ei OH_β -kopling og som samstundes kan gje opphav til mange og store nok koplingar til å kunne svare til ein sjulinja struktur på totalt rundt 10,5 mT. I figur 6.4 er ein mogleg dannelsesmekanisme for det protonerte karbonylanionet skissert.

Krystallstrukturen til N-acetyl-L-tyrosin viser at O_4 er hydrogenbunde til O_3 og O_2 i omliggande molekyll, sjå figur 5.16. Analysen i kapittel 5.4.2 viser at dersom det adderte protonet $H(O_4)$ ligg stabilisert i krystallgitteret langs retninga til hydrogenbindinga til O_2 , har retninga C_{10} - HO_4 eit avvik på berre 17 grader til t_{maks}^β til kopling V^+ . Kopling V^+ kan difor med rimeleg sannsyn tilskrivas $H(O_4)$. Andre moglege koplingar i det protonerte karbonylanionet er koplingar til metylgruppa, N, $H(N)$ og H_1 . Ved hjelp av DFT er storleiken på desse koplingane forsøkt estimert, men berekningane viser stor variasjon i storleiken til koplingane alt etter grad av restriksjon på radikalgeometrien under optimalisering. Figur 5.17 viser i alle høve at den eksperimentelle koplinga V^+ , tre ekvivalente koplingar til

metylgruppa, ei nitrogenkopling og ei lita kopling til H(N), kan gje eit absorpsjonsspekter som liknar det eksperimentelle EIE-spekteret til kopling X⁺ (knytt til radikal C). Det ser med andre ord som at ein slik radikalmodell under rette føresetnadar kan svare til radikal C, observert i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved 77 K.



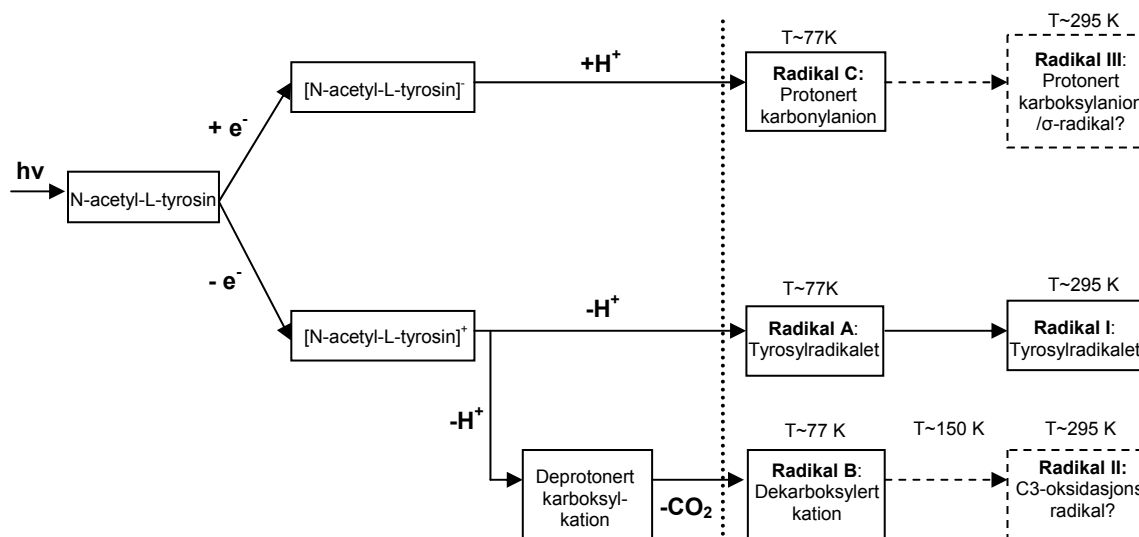
Figur 6.4: Tenkt danningsmekanisme for det protonerte karbonylanionet i N-acetyl-L-tyrosin. Ved elektroninnfangning på O4 vert det danna eit karbonylanion med den upara spinnettelleiken hovudsakleg lokalisert til C10. Den negative overskotsladninga på O4 kan i neste omgang nøytralisert ved protonering. R markerar den aromatiske ringen i N-acetyl-L-tyrosin.

I både EPR- og ENDOR-spektra har resonansane knytt til radikal C relativt låg intensitet i forhold til resonansane knytt til radikal A (tyrosylradikalet) og radikal B (det dekarboksylerte kationet). På grunn av denne svake intensiteten er det vanskeleg å følgje radikal C under oppvarming. EPR-spektra både ved 77 K og etter oppvarming til 240 K ser ut til å ha resonanslinjer på flankane i spektra, men om desse resonanslinjene stammar frå same radikal er uklart. Sidan radikal C ikkje er observert i studiane av romtemperaturbestrålte krystallar, er det likevel mest sannsynleg at radikal C rekombinerar eller vert omdanna til eit anna radikal ved oppvarming frå 77 K.

6.3 Oppsummering og nokre forslag til vidare studiar

Figur 1.1 i kapittel 1.2 skisserar ulike strålingsprodukt som har vorte observert danna i enkle aminosyrer som α -glysin og L- α -alanin. I kapittel 1.2 vart det og gjeve dømer på strålingsprodukt danna i ulike dipeptider og det syntes som strålingsprodukta jamnt over passa inn i skjemaet i figur 1.1.

I figur 6.5 er det gjort eit forsøk på å etablere eit liknande skjema for stråleprodukta danna i N-acetyl-L-tyrosin etter bestråling ved 77 K og 295 K. Dersom strålingsprosessane i N-acetyl-L-tyrosin følgjer same "oppskrift" som strålingsprosessane i enkle aminosyrer, må ein gå ut frå at det ved bestråling både skjer oksidasjonsprosessar (kationdanning) og reduksjonsprosessar (aniondanning). Både tyrosylradikalet og det dekarboksylerte kationet høyrer til på oksidasjonssida i eit slikt skjema.



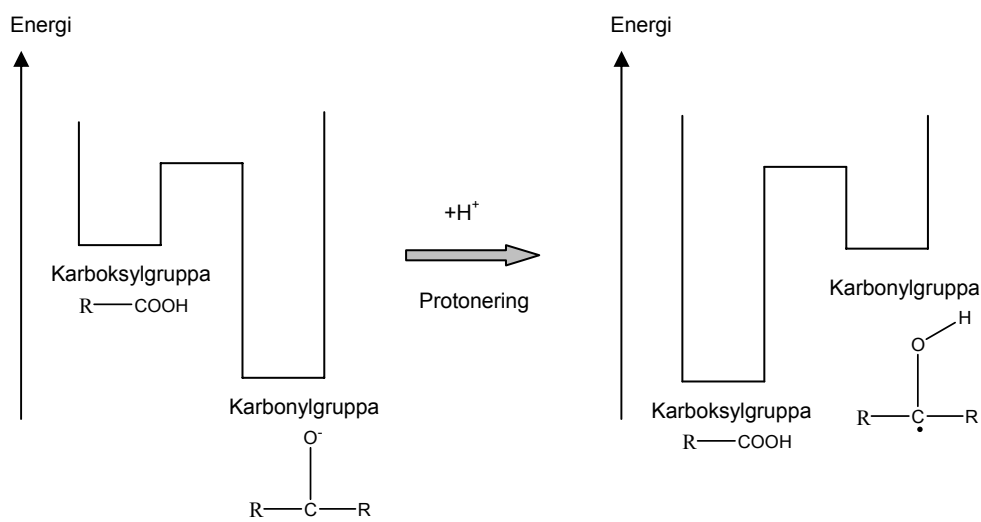
Figur 6.5: Skjema over radikala føreslått danna i einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin etter bestråling ved 77 K og romtemperatur (295 K). Dei heiltrekte boksane og pilene til høgre for den loddrette, prikka linja, markerar radikal og radikalprosessar som med rimeleg visse er identifisert i denne oppgåva. Dei stipla linjene og boksane representerer radikal og radikalprosessar, som ikkje er fullt ut identifiserte i dette arbeidet.

Tyrosylradikalet er observert både ved 77 K (radikal A) og ved romtemperatur (radikal I). Det dekarboksylerte kationet (radikal B) er og observert ved 77 K men forsvinn ved temperaturar rundt 150 K. Som tidlegare nemnt er dei dekarboksylerte produkta i dipeptida N-acetylglysin, glycyl-glysin og N-formylglysin alle forløparar til "backbone"-radikal ved romtemperatur. Slike "backbone"-radikal vert gjerne danna ved at dekarboksyleringsproduktet stel protonet bunde til det sentrale karbonatomet C_α i eit omliggande molekyl i krystallen. Kandidaten til

radikal II danna ved abstraksjon av H(3-1)/H(3-2), sjå figur 4.15, kan tenkast å verte danna ved ein liknande mekanisme og det er difor sett ei stipla pil mellom radikal B og radikal II i figur 6.5. Sidan radikal II ikkje er fullt ut identifisert kan denne hypotesen ikkje stadfestast, men radikal II må i alle høve ha ein forløpar ved låge temperaturar og radikal B kan synast som eit rimeleg alternativ.

I figur 1.1 er det vist at reduksjon av enkle aminosyrer kan leie til anion, protonerte anion, deaminerte radikalprodukt og ulike romtemperaturprodukt. I kapittel 5.4 og 6.2 vart det konkludert med at det protonerte karbonylanionet er ein mogleg modell for radikal C. Radikalet kan ikkje seiast å vere fullt ut identifisert sidan ein berre har ei β -kopling og dei ulike EPR- og EIE-spektra å gå ut frå. Men modellen synast rimeleg og det er difor gått ut frå at radikal C høyrer til på reduksjonssida i radikalskjemaet i figur 6.5. Oppvarmingsforsøket gjer det ikkje klart om radikal C er stabilt til romtemperatur eller om radikalet forsvinn, men sidan radikalet ikkje er observert i einkrystallar bestrålte ved romtemperatur virkar det mest sannsynleg at radikal C ikkje er stabilt ved oppvarming.

I figur 6.5 er det sett ei stipla pil mellom radikal C og radikal III ved romtemperatur. Ein slik overgang medfører at karbonylanionet (radikal C) må deprotonere og at det upara spinnet må overførast til karboksylgruppa for å få danna karboksylanionet som er forløparen til begge dei to radikalkandidatane til radikal III ved romtemperatur. Sinclair og Codella (1973) har i sine studiar på N-acetylglysin føreslått at karboksylanionet ved temperaturar rundt 123 K vert omdanna til eit karbonylanion. Mekanismen tenkt å ligge til grunn for ein slik prosess er at karbonylgruppa i N-acetylglysin representerar ein potensialbrønn (elektronfelle) som er høgare i energi enn potensialbrønnen til karboksylgruppa, men at elektron ved termisk oppvarming kan få høg nok energi til å sleppe unna karboksylfella for så å migrere til karbonylgruppa. I vårt tilfelle kan ein tenke seg ein reversert prosess; det vil seie at karbonylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin representerar ein potensialbrønn som i utgangspunktet ligg noko lågare i energi enn potensialbrønnen til karboksylgruppa, sjå figur 6.6. Det vil dermed vere størst sannsyn for at eit innkommande elektron vil verte innfanga av karbonylgruppa. Ved ei etterfølgjande protonering kan det hypotetisk skje prosessar som fører til at potensialbrønnen til karbonylgruppa vert høgare i energi enn potensialbrønnen til karboksylgruppa. Slike prosessar kan blant anna skuldast endringar i elektronaffinitet og endringar av spinnpopulasjon på dei ulike energinivåa. Ved oppvarming kan så det upara elektronet få tilført nok energi til å unnsleppe karbonylfella og verte overført til karboksylgruppa. I ein slik prosess må naturlegvis karbonylgruppa deprotonere, anten rett før, simultant med eller rett etter elektronoverføringa. Karboksylgruppa må på si side protonere etter elektroninnfanginga, for å få danna radikalkandidatane til radikal III ved romtemperatur.



Figur 6.6: Hypotetisk prosess til grunn for overgangen mellom eit radikal i karbonylgruppa (radikal C) til eit radikal i karboksylgruppa (radikal III) i N-acetyl-L-tyrosin. Karbonylgruppa er gått ut frå å ha lågare potensiell energi enn karboksylgruppa i eit uskada N-acetyl-L-tyrosin-molekyl og vil difor vere ei meir effektiv elektronfelle enn karboksylgruppa. Ved protonering tenker ein seg at karbonylgruppa, gjennom ulike prosessar, får høgare potensiell energi enn karboksylgruppa. Ei etterfølgjande oppvarming kan så føre til at det upara elektronet vert overført frå karbonylgruppa til karboksylgruppa i N-acetyl-L-tyrosin. Energiskalaen langs y-aksen er vilkårleg og x-aksen vil vere gjeve av elektronkoordinatane i molekylet.

Alt i alt er haldepunkta for prosessen skissert i figur 6.6 og i avsnittet over, få og usikre. I tillegg har ingen av dei to modellane for radikal III (σ -radikala og det protonerte karboksylanionet) eit tilfredstillande samsvar med dei eksperimentelle data for radikalet. Ei anna hypotese kan difor vere at radikal III berre tilsynelatande har likskapstrekk med desse modellane, men i realiteten er eit anna radikal danna ved oppsplitting og eventuelt reorganisering av N-acetyl-L-tyrosin-molekylet etter bestråling. Med berre ei kopling vert identifikasjon av eit slikt radikalfragment vanskeleg. Om radikal C er forløparen til radikal III kan med andre ord verken stadfestast eller forkastast inntil radikala er fullstendig identifiserte og likeeins for prosessen skissert i figur 6.6. I tillegg til denne erkjenninga skal ein hugse på at det er observert koplingar både i lågtemperatur- og i romtemperaturreksperimenta, som det ikkje har lukkast å knyte til nokon av radikala A-C eller I-III. Det er difor fullt mogleg at det er fleire radikal enn dei radikala som er observerte i denne oppgåva, som gjev bidrag til den samla resonansen ved 77 K og 295 K. Dette vil igjen bety at det kan vere andre moglege radikalprosessar enn dei som er skisserte i dette kapitlet.

Etter analysen og drøftingane av dei eksperimentelle resultata teke opp etter bestråling av einkrystallar av N-acetyl-L-tyrosin ved 295 K og 77 K, sit ein altså att med eit par uløyste spørsmål. For å finne svara må ein anten gjere ei ny rekke forsøk eller nytte andre analytiske metodar enn dei som er nytta i dette arbeidet. Det er mogleg at forsøk ved 4-10 K kan gje ein sikrere identifikasjon av radikal C og kanskje kan andre, til no uobserverte radikal

identifiserast. I tillegg er det ein god del ENDOR-resonanslinjer både i 77 K- og i 295 K-spektra som berre har lete seg identifisere i enkelte plan eller ved enkelte orienteringar, så ved å gjere eksperiment der desse vert følgde med spesiell merksemd har ein moglegheit for å identifisere fleire av koplingane ved dei ulike temperaturane. I det føreliggande arbeidet har dei fleste verkty tilgjengelege for analyse av EPR- og ENDOR-data vorte nytta, men det har ikkje vorte gjort vellukka DFT ONIOM-berekningar på dei ulike radikalmodellane. Dette er berekningar som betre modellerar molekyl i einkrystallar ved at vekselverknadane frå dei omliggande molekyla vert inkluderte i berekningane. ONIOM-berekningar er førebels tidkrevjande og har ikkje vorte prioriterte i dette arbeidet, men kan kanskje gje nokre svar spesielt med tanke på radikal II ved romtemperatur og radikal C ved 77 K.

Referansar

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. og Watson, J. D., *Molecular Biology of the Cell*, 3. ed. Garland Publ. Inc., New York (1994).

Atherton, N. M., *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood PTR Prentice Hall, London (1993).

Attix, F.H., *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. John Wiley & Sons, Inc., New York (1986).

Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, s. 5648- 5652 (1993).

Bernhard, W.A., Solid-State Radiation Chemistry of DNA: The Bases. *Advances in Radiation Biology* **9**, s. 199-280 (1981).

Bernhard, W. A., The use of alpha hyperfine coupling tensors as a measure of unpaired spin density and free radical geometry. *J. Chem. Phys.*, **81**, s. 5928-5936 (1984).

Box, H. C., *Radiation Effects: ESR and ENDOR Analysis*. Academic Press Inc., New York (1977).

Box, H. C., Budzinski, E. E. og Lilga, K. T., Radiation damage to peptides: An ENDOR study of X-irradiated Acetylglycine. *J. Chem. Phys.*, **57**, s. 4295-4298 (1972).

Bruker WINEPR System. Version 2.11. Bruker-Frantzen Analytik GmbH (1996).

Böhme, U. R. og Wolf, H. C., ENDOR studies of X-irradiated naphthalene single crystals. *Chem. Phys. Lett.*, **17**, s. 582-587 (1972).

Camebridge Soft Corporation, *ChemDraw Std. 7.0*. www.camebridgesoft.com (2002).

Cramer. C. J., *Computational Chemistry, Theory and Models*. Academic Press Inc., New York (2004).

Eklund, H., Uhlin, U., Färnegårdh, M., Logan, D. T. og Nordlund, P., Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **77**, s.177-368 (2001).

Eliassen, M. H., Radikaldannelse i cytosin:N-benzoylglycin. Masteravhandling, Fysisk institutt, Universitetet i Oslo (2005).

Fasanella, E. L. og Gordy, W., Electron spin resonance of an irradiated single crystal of L-tyrosine-HCl. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **62**, s. 299-304 (1969).

Fessenden, R. W. og Schuler, R., H. ESR spectrum of the cyclohexadienyl radical. *J. Chem. Phys.*, **38**, s. 773-774 (1963a).

Fessenden, R. W. og Schuler, R. H., Electron spin resonance studies of transient alkyl radicals. *J. Chem. Phys.*, **39**, s. 2147-2195 (1963b).

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery Jr., J. A., Vreven, T., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Peterson, G. A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Kox, J. E., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y., Morokuma, K., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dapprich, S., Daniels, A. D., Strain, M. C., Farkas, O., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Gonzales, C. og Pople, J. A., *Gaussian 03, Revision C. 02*. Gaussian Inc., Wallingford, CT (2004).

Gauld, J. W., Eriksson, L. A. og Radom, L., Assessment of procedures for calculating radical hyperfine structures. *J. Phys. Chem. A*, **101**, s.1352-1359 (1997).

Gaussian Inc., *GaussView 3.0*, <http://www.gaussian.com> (2003).

Gordy, W., *Theory and Application of Electron Spin Resonance*. John Wiley & Sons, New York (1980).

- Hall, E. J., *Radiobiology for the Radiologist*, 4. ed. J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1994).
- Haynes, J. C., Kuroda, S., Matsuki, K. og Miwagawa, I., ESR and ENDOR studies of X-irradiated N-acetyl-D, L-Alanin. *Radiat. Res.*, **84**, s. 426-433 (1980).
- Heller, C. og Cole, T., Electron Magnetic Resonance of an Oriented Allyl-Type Free Radical. *J. Chem. Phys.* **37**, s. 243-250 (1962).
- Heller, C. og McConnell, H.M., Radiation damage in organic crystals. II. Electron spin resonance of (CO₂H)CH₂CH(CO₂H) in β-succinic acid. *J. Chem. Phys.* **32**, s. 1535-1539 (1960).
- Hemmer, P. C. *Kvantemekanikk*. Tapir akademisk forlag, Trondheim (2000).
- Henriksen, T., Saxebøl og G., Melø, T. B., I *Free radicals in Biology*; Pryor, W. A. Academic Press Inc., New York (1976).
- Hoganson, C. W., Lydakis-Simantiris, N., Tang, X., Tommos, C., Warncke, K., Babcock, G. T., Diner, B. A., McCracken, J. og Styring, S., A hydrogen-atom abstraction model for the function of Y_Z in photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth. Res.*, **46**, s. 177-184 (1995).
- Hoganson, C. W., Sahlin, M., Sjöberg, B. M. og Babcock, G. T., Electron magnetic resonance of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase from escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, s. 4672- 4679 (1996).
- Hohenberg, P. og Kohn, W., Inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B*, **136**, s. 864-871 (1964).
- Katayama, M., Electron spin resonance of gamma-irradiated single crystals of acetyl-DL-alanin and chloroacetyl-DL-alanin. *J. molec. Spectrosc.*, **9**, s.429-435 (1962).
- Katayama, M. og Gordy, M., Electron spin resonance of γ-irradiated glycylglycine. *J. Chem. Phys.*, **35**, s. 117-122 (1961).
- Kozzelak, S. N. og van der Helm, D., N-Acetyl-L-tyrosine. *Acta Cryst.*, **B37**, s.1122- 1124 (1981).
- Lee, C., Yang, W. og Parr, R.G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, **37**, s. 785-789 (1988).

Liming, F. G. og Gordy, W., Hydrogen-addition radicals formed in the aromatic rings of amino acids, polyamino acids and proteins. *Proc. N. A. S.*, **60**, s. 794-801 (1968).

Lund, A og Shiotani, M., *Radical ionic system, properties in condensed phases*. Kluwer Academic Publishers, Nederland (1991).

Lund, A., Thuomas, K. Å. og Maruani, J., Calculation of powder ESR spectra of radicals with hyperfine and quadrupolar interactions. Application to mono- and dichloroalkyl radicals. *J. Magn. Reson.*, **30**, s. 505-514 (1978).

McConnell, H.M. og Chesnut, D.B., Theory of isotropic hyperfine interactions in π -electron radicals. *J. Chem. Phys.*, **28**, s. 107-117 (1958).

Melø, T. B., Free radicals in a single crystal of glycyl-glycine at room temperature. *Int. J. Radiat. Biol.*, **20**, s. 557-575 (1971).

Melø, T. B., Radiation damage to proteins- An ESR study of a single crystal of glycyl-glycine at low temperatures. *Int. J. Radiat. Biol.*, **23**, s. 247-261 (1973).

Melø, T. B., Electron spin resonance studies of radiation induced radicals and their reactions in single crystals of protein components. Institute of physics, University of Oslo (1975).

Mezzetti, A., Maniero, A. L., Brustolon, M., Giacometti, G., Brunel, L. C., A tyrosyl radical in an irradiated single crystal of N-acetyl-L-tyrosine studied by X-band cw-EPR, high-frequency EPR and ENDOR spectroscopies. *J. Phys. Chem. A*, **103**, s. 9636-9643 (1999).

Miyagawa, I., Kurita, Y. og Gordy, W., Electron spin resonance of an irradiated single crystal of N-acetylglycine. *J. Chem. Phys.*, **33**, s. 1599-1603 (1960).

Molecular Simulations Inc., *WebLab ViewerPro 3.7*, www.msi.com (2000).

Nelson, W. H., Estimates of errors in eigenvectors and eigenvalues from magnetic resonance results by use of linear data-fitting techniques. *J. Magn. Res.*, **38**, s. 71-78 (1980).

Nelson, W. H. og Gill, C. D. ESR and ENDOR studies of x-irradiated 4-phenyl-3-thiosemicarbazide single crystals. *Mol. Phys.*, **36**, s. 1779-1788 (1978).

OriginLab Corporation, *Origin 7*, <http://www.originlab.com> (2002).

Sand, O., Sjaastad, V. S. og Haug, E., *Menneskets fysiologi, 1. utg.* Gyldendal Norsk Forlag, Oslo (2001).

Sagstuen, E., Close, D. M., Vågane, R., Hole, E. O. og Nelson, W. H., Spin transfer in amino acid nucleic acid base complexes: EPR, ENDOR and DFT study of x-irradiated N-Formylglycine Cytosine complex crystals (Forventa publisert i løpet av 2006).

Sagstuen, E., Hole, E. O., Haugedal, S. R. og Nelson, W. H., Alanine radicals: Structure determination by EPR and ENDOR of single crystals X-irradiated at 295 K. *J. Phys. Chem. A*, **101**, s. 9763-9772 (1997).

Sagstuen, E., Lund, A., Itagaki, Y. og Maruani, J., Weakly coupled proton interaction in the malonic acid radical: Single crystal ENDOR analysis and EPR simulation at microwave saturation. *J. Phys. Chem. A*, **104**, s. 6362-6371 (2000).

Sagstuen, E., Sanderud, A. og Hole, E. O., Review: The solid-state radiation chemistry of simple amino acids, revisited. *Radiat. Res. Soc.*, **162**, s.112-119 (2004).

Sagstuen, E., Munnleg referanse (2006).

Salih, N. A., Sanderud, A., Sagstuen, E., Eid, O. I. og Lund, A., ESR and ENDOR studies of hippuric acid single crystals x-irradiated at 295 K: A reinvestigation. *J. Phys. Chem.*, **101**, s. 8214-8220 (1997).

Saxeboel, G., An ESR study of irradiated N-acetyl-L-alanine. *Int. J. Radiat. Biol.*, **27**, s. 293-296 (1975).

Shodor Education Foundation Inc. Background reading for basis sets.

<http://www.shodor.org/chemviz/basis/students/background.html>, (2000, henta 29.november 2005).

Sinclair J., og Codella P., Radiation damage produced in single crystals of N-acetylglucosamine. *J. Chem. Phys.*, **59**, s. 1569-1576 (1973).

Smith, W. L., Eling, T. E., Kulmacz, R. J., Marnett, L. J. og Tsai, A., Tyrosyl radicals and their role in hydroperoxide-dependent activation and inactivation of prostaglandin endoperoxide synthase. *Biochemistry*, **31**, s. 3-7 (1992).

Stone, A. J., Gauge invariance of the g-tensor. *Proc. Roy. Soc. (Lond.) Ser. A*, **271**, s. 424-434 (1963).

Sybesma, C., *Biophysics An Introduction*. Kluwer Academic Publishers, Netherland (1989).

Tra-Con Incorporation, www.tra-con.com (2006).

Theisen, H. og Sagstuen, E., The indole H-adduct radical in single crystals of tryptamin-HCl: An ESR- ENDOR study. *J. Chem. Phys.*, **74**, s. 2319-2324 (1981).

Wasowicz, T., Elexys 560 to WinEPR Converter ver 2.0 (2004).

Whiffen, D. H., The $>\text{CH}_2$ hyperfine coupling in cyclohexadienyl. *Mol. Phys.* **6**, s. 223-224 (1963).

Wikipedia, *Density Functional Theory*,
http://en.wikipedia.org/wiki/Density_functional_theory (2006, henta 1.januar 2006).

Zhurko, G. A., *Chemcraft version 1.05*. www.chemcraftprog.com (2006).

Appendiks

A Krystallografiske data

Dette appendikset inneheld data frå ESRLIB (Sagstuen, 2006) for alle atoma i N-acetyl-L-tyrosin. Atomposisjon, i inputdata, er gjeve som fraksjon av akselengder og er henta frå krystallografisk artikkel (Koszelak og Helm, 1980). I outputfila er atomposisjonane gjeve som koordinatar i <a>, , <c*> referansesystemet. I tillegg reknar ESRLIB ut interatomiske avstandar og retningscosinusar.

INPUTDATA FOR N-ACETYL-L-TYROSIN

Atomnummer	x	y	z	Atomsymbol
1	0.4517	1.0704	0.2251	C1
2	0.5728	1.0358	0.1296	C2
3	0.3861	0.8873	0.2687	C3
4	0.3190	0.8997	0.3800	C4
5	0.4721	0.9716	0.4684	C5
6	0.4209	0.9718	0.5726	C6
7	0.2136	0.9005	0.5892	C7
8	0.0583	0.8278	0.5017	C8
9	0.1112	0.8287	0.3975	C9
10	0.2589	1.3439	0.1479	C10
11	0.0385	1.4360	0.0993	C11
12	0.2474	1.1824	0.1933	N
13	0.7763	1.0035	0.1432	O1
14	0.4320	1.0375	0.0339	O2
15	0.1550	0.8999	0.6899	O3
16	0.4500	1.4149	0.1442	O4
17	0.5600	1.1340	0.2780	H1
18	0.5270	0.8120	0.2730	H3-1
19	0.2650	0.8340	0.2160	H3-2
20	0.6150	1.0200	0.4590	H5
21	0.5360	1.0150	0.6330	H6
22	-0.0890	0.7730	0.5150	H8
23	0.0070	0.7700	0.3370	H9
24	0.0380	1.4650	0.0230	H11-1
25	-0.1010	1.3590	0.1020	H11-2
26	0.0290	1.5480	0.1370	H11-3
27	0.1080	1.1310	0.1900	HN
28	0.4970	1.0100	-0.0180	HO2
29	0.2760	0.9170	0.7410	HO3

ANTALL ATOMER ER 29

KRYSTALLAKSER

A0= 5.994

B0= 7.495

C0=12.510

DEN MONOKLINE VINKEL BETA ER 101.190 GRADER

KOORDINATAR I REFERANSESYSTEMET <a>, , <c*>

Atomnummer	<a>		<c*>	Atomsymbol
1	2.1612	8.0226	2.7625	C1
2	3.1190	7.7630	1.5901	C2
3	1.6623	6.6504	3.2972	C3
4	0.9895	6.7433	4.6635	C4
5	1.6930	7.2822	5.7478	C5
6	1.1327	7.2834	7.0275	C6
7	-0.1501	6.7495	7.2303	C7
8	-0.8686	6.2043	6.1565	C8
9	-0.2985	6.2111	4.8778	C9
10	1.1926	10.0728	1.8155	C10
11	-0.0101	10.7627	1.2187	C11
12	1.0136	8.8622	2.3716	N
13	4.3056	7.5210	1.7571	O1
14	2.5069	7.7763	0.4160	O2
15	-0.7461	6.7448	8.4672	O3
16	2.3471	10.6049	1.7699	O4
17	2.6817	8.4993	3.4117	H1
18	2.4961	6.0859	3.3503	H3-1
19	1.0640	6.2508	2.6508	H3-2
20	2.5720	7.6449	5.6329	H5
21	1.6760	7.6074	7.7683	H6
22	-1.7837	5.7936	6.3202	H8
23	-0.7762	5.7711	4.1357	H9
24	0.1719	10.9802	0.2823	H11-1
25	-0.8530	10.1857	1.2518	H11-2
26	-0.1588	11.6023	1.6813	H11-3
27	0.1861	8.4768	2.3317	HN
28	3.0227	7.5699	-0.2209	HO2
29	-0.1446	6.8729	9.0937	HO3

BINDINGSAVSTANDER OG RETNINGSCOSINUSAR

BINDING	AVSTAND	<a>		<c*>	NORM
C2 - C1 (2- 1)	1.5360	-0.6236	0.1690	0.7633	1.0000
C3 - C1 (3- 1)	1.5549	0.3209	0.8825	-0.3439	1.0000
C4 - C1 (4- 1)	2.5736	0.4553	0.4971	-0.7387	1.0000
C5 - C1 (5- 1)	3.1112	0.1505	0.2380	-0.9595	1.0000
C9 - C1 (9- 1)	3.7157	0.6620	0.4875	-0.5693	1.0000
C10 - C1 (10- 1)	2.4573	0.3942	-0.8343	0.3854	1.0000

Appendiks

BINDING		AVSTAND	<a>		<c*>	NORM
C11 - C1	(11- 1)	3.8218	0.5682	-0.7170	0.4039	1.0000
N - C1	(12- 1)	1.4747	0.7782	-0.5694	0.2650	1.0000
O1 - C1	(13- 1)	2.4209	-0.8858	0.2072	0.4153	1.0000
O2 - C1	(14- 1)	2.3845	-0.1449	0.1033	0.9840	1.0000
O4 - C1	(16- 1)	2.7728	-0.0670	-0.9313	0.3580	1.0000
H1 - C1	(17- 1)	0.9590	-0.5427	-0.4971	-0.6770	1.0000
H3-1- C1	(18- 1)	2.0514	-0.1632	0.9441	-0.2866	1.0000
H3-2- C1	(19- 1)	2.0870	0.5258	0.8490	0.0535	1.0000
H5 - C1	(20- 1)	2.9242	-0.1405	0.1292	-0.9816	1.0000
H9 - C1	(23- 1)	3.9476	0.7441	0.5703	-0.3479	1.0000
HN - C1	(27- 1)	2.0720	0.9533	-0.2192	0.2079	1.0000
HO2 - C1	(28- 1)	3.1381	-0.2745	0.1442	0.9507	1.0000
C3 - C2	(3- 2)	2.5048	0.5816	0.4442	-0.6815	1.0000
C4 - C2	(4- 2)	3.8757	0.5495	0.2631	-0.7930	1.0000
C10 - C2	(10- 2)	3.0161	0.6387	-0.7658	-0.0747	1.0000
N - C2	(12- 2)	2.5003	0.8420	-0.4396	-0.3126	1.0000
O1 - C2	(13- 2)	1.2225	-0.9706	0.1980	-0.1366	1.0000
O2 - C2	(14- 2)	1.3242	0.4623	-0.0100	0.8867	1.0000
O4 - C2	(16- 2)	2.9503	0.2616	-0.9632	-0.0609	1.0000
H1 - C2	(17- 2)	2.0128	0.2173	-0.3658	-0.9050	1.0000
H3-1- C2	(18- 2)	2.5098	0.2482	0.6682	-0.7013	1.0000
H3-2- C2	(19- 2)	2.7631	0.7437	0.5473	-0.3839	1.0000
HN - C2	(27- 2)	3.1083	0.9436	-0.2296	-0.2386	1.0000
HO2 - C2	(28- 2)	1.8238	0.0528	0.1059	0.9930	1.0000
C4 - C3	(4- 3)	1.5259	0.4409	-0.0609	-0.8955	1.0000
C5 - C3	(5- 3)	2.5310	-0.0121	-0.2496	-0.9683	1.0000
C6 - C3	(6- 3)	3.8206	0.1386	-0.1657	-0.9764	1.0000
C8 - C3	(8- 3)	3.8445	0.6583	0.1160	-0.7437	1.0000
C9 - C3	(9- 3)	2.5566	0.7670	0.1718	-0.6183	1.0000
C10 - C3	(10- 3)	3.7588	0.1249	-0.9105	0.3942	1.0000
N - C3	(12- 3)	2.4839	0.2611	-0.8905	0.3726	1.0000
O1 - C3	(13- 3)	3.1807	-0.8311	-0.2737	0.4842	1.0000
O2 - C3	(14- 3)	3.2065	-0.2634	-0.3511	0.8985	1.0000
H1 - C3	(17- 3)	2.1145	-0.4821	-0.8744	-0.0542	1.0000
H3-1- C3	(18- 3)	1.0083	-0.8269	0.5598	-0.0527	1.0000
H3-2- C3	(19- 3)	0.9671	0.6186	0.4131	0.6683	1.0000
H5 - C3	(20- 3)	2.6967	-0.3373	-0.3688	-0.8661	1.0000
H9 - C3	(23- 3)	2.7244	0.8950	0.3227	-0.3078	1.0000
HN - C3	(27- 3)	2.5391	0.5814	-0.7193	0.3802	1.0000
HO2 - C3	(28- 3)	3.8824	-0.3504	-0.2369	0.9062	1.0000
C5 - C4	(5- 4)	1.4003	-0.5024	-0.3848	-0.7743	1.0000
C6 - C4	(6- 4)	2.4291	-0.0589	-0.2223	-0.9732	1.0000
C7 - C4	(7- 4)	2.8083	0.4058	-0.0022	-0.9140	1.0000
C8 - C4	(8- 4)	2.4438	0.7604	0.2206	-0.6109	1.0000
C9 - C4	(9- 4)	1.4101	0.9135	0.3774	-0.1520	1.0000
N - C4	(12- 4)	3.1214	-0.0077	-0.6788	0.7343	1.0000
H1 - C4	(17- 4)	2.7412	-0.6173	-0.6406	0.4567	1.0000
H3-1- C4	(18- 4)	2.1039	-0.7161	0.3125	0.6242	1.0000
H3-2- C4	(19- 4)	2.0735	-0.0359	0.2375	0.9707	1.0000
H5 - C4	(20- 4)	2.0632	-0.7670	-0.4370	-0.4698	1.0000
H6 - C4	(21- 4)	3.2950	-0.2083	-0.2622	-0.9422	1.0000
H8 - C4	(22- 4)	3.3671	0.8236	0.2821	-0.4920	1.0000
H9 - C4	(23- 4)	2.0836	0.8474	0.4666	0.2533	1.0000
HN - C4	(27- 4)	3.0146	0.2665	-0.5750	0.7735	1.0000

Appendiks

BINDING		AVSTAND	<a>		<c*>	NORM
C6 - C5	(6- 5)	1.3970	0.4011	-0.0009	-0.9160	1.0000
C7 - C5	(7- 5)	2.4245	0.7602	0.2197	-0.6114	1.0000
C8 - C5	(8- 5)	2.8091	0.9119	0.3837	-0.1455	1.0000
C9 - C5	(9- 5)	2.4229	0.8220	0.4421	0.3591	1.0000
N - C5	(12- 5)	3.7890	0.1793	-0.4170	0.8910	1.0000
O3 - C5	(15- 5)	3.6923	0.6606	0.1455	-0.7365	1.0000
H1 - C5	(17- 5)	2.8136	-0.3514	-0.4326	0.8303	1.0000
H3-1- C5	(18- 5)	2.7971	-0.2871	0.4277	0.8571	1.0000
H3-2- C5	(19- 5)	3.3243	0.1892	0.3103	0.9316	1.0000
H5 - C5	(20- 5)	0.9578	-0.9177	-0.3787	0.1199	1.0000
H6 - C5	(21- 5)	2.0466	0.0083	-0.1589	-0.9873	1.0000
H8 - C5	(22- 5)	3.8251	0.9089	0.3892	-0.1496	1.0000
H9 - C5	(23- 5)	3.3135	0.7452	0.4560	0.4865	1.0000
HN - C5	(27- 5)	3.9202	0.3844	-0.3047	0.8714	1.0000
HO3 - C5	(29- 5)	3.8392	0.4786	0.1066	-0.8715	1.0000
C7 - C6	(7- 6)	1.4042	0.9136	0.3802	-0.1444	1.0000
C8 - C6	(8- 6)	2.4349	0.8219	0.4432	0.3577	1.0000
C9 - C6	(9- 6)	2.7964	0.5118	0.3835	0.7688	1.0000
O3 - C6	(15- 6)	2.4274	0.7740	0.2219	-0.5931	1.0000
H5 - C6	(20- 6)	2.0364	-0.7068	-0.1775	0.6848	1.0000
H6 - C6	(21- 6)	0.9741	-0.5578	-0.3326	-0.7604	1.0000
H8 - C6	(22- 6)	3.3505	0.8705	0.4446	0.2111	1.0000
H9 - C6	(23- 6)	3.7807	0.5049	0.4000	0.7649	1.0000
HO3 - C6	(29- 6)	2.4635	0.5185	0.1666	-0.8387	1.0000
C8 - C7	(8- 7)	1.4024	0.5124	0.3888	0.7657	1.0000
C9 - C7	(9- 7)	2.4179	0.0614	0.2227	0.9730	1.0000
O3 - C7	(15- 7)	1.3730	0.4341	0.0034	-0.9009	1.0000
H5 - C7	(20- 7)	3.2807	-0.8297	-0.2729	0.4869	1.0000
H6 - C7	(21- 7)	2.0881	-0.8745	-0.4108	-0.2577	1.0000
H8 - C7	(22- 7)	2.1002	0.7779	0.4551	0.4333	1.0000
H9 - C7	(23- 7)	3.3054	0.1894	0.2960	0.9362	1.0000
HO3 - C7	(29- 7)	1.8675	-0.0029	-0.0661	-0.9978	1.0000
C9 - C8	(9- 8)	1.4000	-0.4072	-0.0049	0.9133	1.0000
O3 - C8	(15- 8)	2.3763	-0.0516	-0.2275	-0.9724	1.0000
H5 - C8	(20- 8)	3.7666	-0.9135	-0.3825	0.1390	1.0000
H6 - C8	(21- 8)	3.3230	-0.7658	-0.4223	-0.4851	1.0000
H8 - C8	(22- 8)	1.0163	0.9004	0.4041	-0.1611	1.0000
H9 - C8	(23- 8)	2.0687	-0.0447	0.2094	0.9768	1.0000
HO3 - C8	(29- 8)	3.0982	-0.2337	-0.2158	-0.9481	1.0000
N - C9	(12- 9)	3.8770	-0.3384	-0.6838	0.6464	1.0000
O3 - C9	(15- 9)	3.6563	0.1224	-0.1460	-0.9817	1.0000
H3-1- C9	(18- 9)	3.1873	-0.8768	0.0393	0.4793	1.0000
H3-2- C9	(19- 9)	2.6111	-0.5218	-0.0152	0.8529	1.0000
H5 - C9	(20- 9)	3.2963	-0.8708	-0.4350	-0.2291	1.0000
H6 - C9	(21- 9)	3.7687	-0.5239	-0.3705	-0.7670	1.0000
H8 - C9	(22- 9)	2.1120	0.7032	0.1977	-0.6829	1.0000
H9 - C9	(23- 9)	0.9861	0.4844	0.4462	0.7525	1.0000
HN - C9	(27- 9)	3.4425	-0.1408	-0.6582	0.7396	1.0000
C11 - C10	(11-10)	1.5096	0.7968	-0.4570	0.3953	1.0000
N - C10	(12-10)	1.3441	0.1332	0.9006	-0.4137	1.0000
O2 - C10	(14-10)	2.9933	-0.4391	0.7672	0.4676	1.0000
O4 - C10	(16-10)	1.2720	-0.9076	-0.4183	0.0359	1.0000
H1 - C10	(17-10)	2.6909	-0.5534	0.5847	-0.5932	1.0000
H3-2- C10	(19-10)	3.9142	0.0329	0.9764	-0.2134	1.0000

Appendiks

BINDING		AVSTAND	<a>		<c*>	NORM
H111- C10	(24-10)	2.0533	0.4971	-0.4419	0.7467	1.0000
H112- C10	(25-10)	2.1249	0.9627	-0.0532	0.2653	1.0000
H113- C10	(26-10)	2.0454	0.6607	-0.7478	0.0656	1.0000
HN - C10	(27-10)	1.9561	0.5146	0.8158	-0.2639	1.0000
HO2 - C10	(28-10)	3.7095	-0.4934	0.6747	0.5490	1.0000
N - C11	(12-11)	2.4472	-0.4183	0.7766	-0.4711	1.0000
O2 - C11	(14-11)	3.9873	-0.6313	0.7490	0.2013	1.0000
O4 - C11	(16-11)	2.4260	-0.9717	0.0650	-0.2272	1.0000
H111- C11	(24-11)	0.9785	-0.1861	-0.2223	0.9571	1.0000
H112- C11	(25-11)	1.0220	0.8248	0.5646	-0.0323	1.0000
H113- C11	(26-11)	0.9700	0.1532	-0.8655	-0.4768	1.0000
HN - C11	(27-11)	2.5499	-0.0770	0.8964	-0.4365	1.0000
O1 - N	(13-12)	3.6074	-0.9126	0.3718	0.1703	1.0000
O2 - N	(14-12)	2.6895	-0.5552	0.4038	0.7271	1.0000
O4 - N	(16-12)	2.2753	-0.5861	-0.7659	0.2644	1.0000
H1 - N	(17-12)	1.9990	-0.8345	0.1815	-0.5203	1.0000
H3-1- N	(18-12)	3.2960	-0.4498	0.8423	-0.2969	1.0000
H3-2- N	(19-12)	2.6268	-0.0192	0.9942	-0.1063	1.0000
H5 - N	(20-12)	3.8140	-0.4086	0.3192	-0.8551	1.0000
H9 - N	(23-12)	3.9838	0.4493	0.7759	-0.4428	1.0000
H111- N	(24-12)	3.0918	0.2722	-0.6850	0.6758	1.0000
H112- N	(25-12)	2.5476	0.7327	-0.5195	0.4396	1.0000
H113- N	(26-12)	3.0592	0.3832	-0.8957	0.2256	1.0000
HN - N	(27-12)	0.9138	0.9057	0.4218	0.0436	1.0000
HO2 - N	(28-12)	3.5253	-0.5699	0.3666	0.7354	1.0000
O2 - O1	(14-13)	2.2581	0.7966	-0.1130	0.5939	1.0000
O4 - O1	(16-13)	3.6532	0.5361	-0.8442	-0.0035	1.0000
H1 - O1	(17-13)	2.5163	0.6454	-0.3888	-0.6575	1.0000
H3-1- O1	(18-13)	2.8057	0.6449	.05115	-0.5678	1.0000
H3-2- O1	(19-13)	3.5944	0.9018	0.3534	-0.2486	1.0000
HO2 - O1	(28-13)	2.3581	0.5440	-0.0208	0.8388	1.0000
O4 - O2	(16-14)	3.1400	0.0509	-0.9008	-0.4312	1.0000
H1 - O2	(17-14)	3.0866	-0.0567	-0.2343	-0.9705	1.0000
H3-1- O2	(18-14)	3.3864	0.0032	0.4992	-0.8665	1.0000
H3-2- O2	(19-14)	3.0664	00.4705	0.4975	-0.7288	1.0000
H111- O2	(24-14)	3.9667	0.5886	-0.8077	0.0337	1.0000
HN - O2	(27-14)	3.0898	0.7511	-0.2267	-0.6200	1.0000
HO2 - O2	(28-14)	0.8452	-0.6103	0.2441	0.7536	1.0000
H6 - O3	(21-15)	2.6644	-0.9091	-0.3237	0.2623	1.0000
H8 - O3	(22-15)	2.5673	0.4042	0.3705	0.8363	1.0000
HO3 - O3	(29-15)	0.8779	-0.6851	-0.1459	-0.7137	1.0000
H1 - O4	(17-16)	2.6909	-0.1244	0.7825	-0.6101	1.0000
H111- O4	(24-16)	2.6618	0.8172	-0.1410	0.5589	1.0000
H112- O4	(25-16)	3.2688	0.9790	0.1282	0.1585	1.0000
H113- O4	(26-16)	2.6985	0.9286	-0.3696	0.0328	1.0000
HN - O4	(27-16)	3.0845	0.7006	0.6899	-0.1821	1.0000
HO2 - O4	(28-16)	3.6920	-0.1830	0.8220	0.5392	1.0000
H3-1- H1	(18-17)	2.4213	0.0767	0.9967	0.0253	1.0000
H3-2- H1	(19-17)	2.8726	0.5632	0.7827	0.2649	1.0000
H5 - H1	(20-17)	2.3825	0.0461	0.3586	-0.9323	1.0000
HN - H1	(27-17)	2.7194	0.9177	0.0083	0.3971	1.0000
HO2 - H1	(28-17)	3.7650	-0.0906	0.2468	0.9648	1.0000
H3-2- H3-1	(19-18)	1.6023	0.8938	-0.1029	0.4366	1.0000
H5 - H3-1	(20-18)	2.7652	-0.0275	-0.5638	-0.8255	1.0000

Appendiks

BINDING		AVSTAND	<a>		<c*>	NORM
H9 - H3-1	(23-18)	3.3799	0.9682	0.0931	-0.2324	1.0000
HN - H3-1	(27-18)	3.4771	0.6643	-0.6876	0.2929	1.0000
HO2 - H3-1	(28-18)	3.9030	-0.1349	-0.3802	0.9150	1.0000
H5 - H3-2	(20-19)	3.6208	-0.4165	-0.3850	-0.8236	1.0000
H9 - H3-2	(23-19)	2.4128	0.7627	0.1988	-0.6154	1.0000
HN - H3-2	(27-19)	2.4141	0.03637	-0.9221	0.1322	1.0000
HO2 - H3-2	(28-19)	3.7180	-0.5268	-0.3548	0.7724	1.0000
H6 - H5	(21-20)	2.3160	0.3869	0.0162	-0.9220	1.0000
HO3 - H6	(29-21)	2.3687	0.7686	0.3101	-0.5595	1.0000
H9 - H8	(23-22)	2.4057	-0.4188	0.0093	0.9080	1.0000
HO3 - H8	(29-22)	3.3976	-0.4824	-0.3177	-0.8163	1.0000
HN - H9	(27-23)	3.3913	-0.2837	-0.7978	0.5319	1.0000
H112- H111	(25-24)	1.6192	0.6330	0.4907	-0.5988	1.0000
H113- H111	(26-24)	1.5664	0.2111	-0.3971	-0.8931	1.0000
HN - H111	(27-24)	3.2353	-0.0044	0.7738	-0.6335	1.0000
H113- H112	(26-25)	1.6350	-0.4246	-0.8664	-0.2627	1.0000
HN - H112	(27-25)	2.2729	-0.4572	0.7518	-0.4751	1.0000
HN - H113	(27-26)	3.2109	-0.1074	0.9734	-0.2026	1.0000
HO2 - HN	(28-27)	3.9223	-0.7232	0.2312	0.6508	1.0000

B Dataprogram

Dette appendikset listar diverse dataprogram som er nytta i oppgåva.

- **WinEPR**

I WinEPR kan innsamla EPR-, ENDOR- og EIE-absorpsjonsspekter vidarebehandlast og listast som datafiler (Bruker, 1996).

- **KRYSTMOD frå ESRLIB**

ESRLIB er ein programpakke som inneheld algoritmar for å berekne ulike molekulære eigenskapar til einkrystallar. KRYSTMOD er eit program som kan konvertere posisjonsparametrar for eit molekyl frå å vere gjeve som ein fraksjon av akselengder i eit koordinatsystem utspent av celleaksane i einingscella, til å vere gjeve som punkt i eit kartesisk koordinatsystem. Programmet gjev og retningscosinusar og bindingsretningar i molekylet (Sagstuen, 2006).

- **MAGRES86**

Dataprogrammet MAGRES bereknar hyperfinkoplingstensorar med prinsipalverdiar og tilhøyrande eigenvektorar ut frå eksperimentelle ENDOR-data (Nelson og Gill, 1978; Nelson, 1980).

- **Elexys 560**

Program som konverterar dei eksperimentelle datafilene til filer som let seg opne i WinEPR (Wasowicz, 2004).

- **WebLab ViewerPro 3.7**

WebLab Viewer kan teikne 3-dimensjonale krystallar og vise korleis molekyla er relaterte innbyrdes i krystallen (Molecular Simulations Inc., 2000).

- **MAGTHEO**

Program for å berekne teoretiske resonanslinjer ut frå berekna hyperfinkoplingsmatriser (Sagstuen, 2006).

- **Gaussian03**

Gaussian03 er ein kvantekjemisk programpakke som blant anna inkluderer dei DFT-algoritmane ein treng for å konstruere teoretiske hyperfinkoplingstensorar (Frisch *et al.*, 2004).

- **Chemcraft 1.4 beta**

Chemcraft er eit molekylprogram som kan vise og redigere 3-dimensjonale strukturformlar. Input-filer kan til dømes vere Gaussian03.out, der både dei ulike optimaliseringsstega og ferdig optimalisert molekylstruktur let seg visualisere (Zhurko, 2005).

- **GaussView 3.0**

GaussView er og eit 3-D molekylprogram. Programmet tolkar Gaussian03-filer og kan nyttast til å konstruere inputfiler til DFT-berekningar (Gaussian Inc., 2003).

- **KvaSat**

KvaSat er eit simuleringsprogram som ut frå prinsipalverdiar og eigenvektorar for ulike tensorar kan berekne 1. og 2. deriverte EPR-spektre (Lund *et al.*, 1978; Sagstuen *et al.*, 2000).

- **ChemDraw Std. 7.0**

Med ChemDraw er det enkelt å konstruere kjemiske strukturformlar (CambridgeSoft, 2002).

- **Origin 7**

Origin er eit svært hending plotteprogram (OriginLab Corporation, 2002).

C Hyperfinkoplingstensorar

Tabell C1 og C2 listar hyperfintensorar frå høvesvis lågtemperaturforsøka (77 K) og romtemperaturforsøka (295 K) som det ikkje har lukkast å knytte til nokon av dei observerte radikala I-III og A-C.

Tabell C1: Hyperfinkoplingstensor for kopling VI \pm , VII $+$ og VIII $+$ observert i H₂O-krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte og målte ved 77K. Tala i parentes representerar standardavvik for det siste talet i den lista verdien. Begge Schonlandvariantane i/ii er viste for kvar kopling.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
VI-		6,09	7,82 (3)	0,933 (1)	-0,067 (5)	-0,354 (3)
Variant	1,73 (3)	2,81	1,08 (6)	0,187 (6)	-0,750 (5)	0,634 (5)
(i)		-5,44	-3,71 (6)	0,308 (3)	0,658 (6)	0,688 (5)
VI-		9,15	11,00 (13)	0,909 (3)	0,117 (9)	-0,399 (7)
Variant	1,85	-2,78	-0,93 (8)	0,049 (5)	0,923 (8)	0,382 (2)
(ii)		-6,37	-4,52 (14)	0,413 (8)	-0,367 (17)	0,833 (6)
VI+		5,73	3,74 (5)	0,112 (8)	-0,287 (11)	-0,951 (6)
Variant	- 1,99 (7)	0,24	-1,75 (13)	0,469 (9)	-0,829 (9)	0,306 (11)
(i)		-5,98	-7,97 (14)	0,876 (3)	0,480 (10)	-0,042 (5)
VI+		7,32	4,76 (11)	0,515 (4)	0,298 (12)	0,804 (2)
Variant	- 2,56 (5)	1,77	-0,79 (8)	0,162 (18)	-0,955 (6)	0,250 (12)
(ii)		-9,08	-11,64 (9)	0,842 (5)	0,002 (18)	-0,540 (3)
VII+		5,64	15,72 (2)	0,159 (2)	-0,847 (5)	0,507 (7)
Variant	10,08 (1)	-1,97	8,11 (2)	0,834 (1)	-0,159 (5)	-0,528 (2)
(i)		-3,67	6,41 (2)	0,528 (1)	0,507 (6)	0,681 (4)
VII+		5,5	15,50 (2)	0,216 (2)	0,820 (1)	0,530 (20)
Variant	10,00 (1)	-2,27	7,73 (2)	0,976 (1)	-0,195 (11)	-0,097 (4)
(ii)		-3,22	6,78 (2)	0,024 (1)	0,538 (17)	-0,842 (2)
VIII+		1,93	15,76 (2)	0,698 (6)	-0,714 (9)	0,048 (3)
Variant	13,83 (1)	0,71	14,54 (2)	0,459 (5)	0,395 (10)	-0,796 (1)
(i)		-2,65	11,18 (2)	0,549 (12)	0,578 (2)	0,604 (3)
VIII+		2,7	16,57 (2)	0,629 (3)	-0,634 (11)	-0,449 (72)
Variant	13,87 (1)	-1,26	12,61 (2)	0,769 (3)	0,424 (59)	0,479 (38)
(ii)		-1,43	12,44 (2)	0,113 (2)	0,647 (70)	-0,754 (44)

Tabell C2: Hyperfinkoplingstensor for kopling 7+ (295 K) observert i krystallar av N-acetyl-L-tyrosin bestrålte ved romtemperatur og nedkjølte til ca. 240 K under målingane. Tala i parentes representerar standardavvik for det siste talet i den lista verdien. Begge Schonlandvariantane i/ii er viste.

Kopling	Isotropverdi (MHz)	Anisotrop verdi (MHz)	Prinsipalverdi (MHz)	Eigenvektorar		
				<a>		<c*>
7+ Variant (i)	84,72 (1)	5,66 (2)	90,38 (2)	0,017 (1)	-0,611 (25)	-0,791 (15)
		-2,52 (2)	82,20 (2)	0,507 (1)	-0,677 (12)	0,534 (20)
		-3,14 (2)	81,58 (2)	0,862 (1)	0,410 (8)	-0,298 (16)
7+ Variant (ii)	84,72 (1)	5,66 (2)	90,38 (2)	0,020 (1)	0,611 (24)	0,792 (15)
		-2,51 (2)	82,21 (2)	0,525 (1)	0,667 (12)	-0,528 (19)
		-3,16 (2)	81,56 (2)	0,851 (1)	-0,426 (9)	0,308 (14)